

**Histologische Charakterisierung der Entzündungsreaktion  
in den Speicheldrüsen von Patienten mit Sjögren-Syndrom  
und im Modell der NOD-Maus**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Bräuer  
geboren am 23.05.1971 in Apolda

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Peter Oelzner, Jena
2. Prof. Dr. med. Sven Koscielny, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. phil. Jörg Kriegsmann, Trier

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.06.2014

*Meiner Mutter, Frau Eva Bräuer, in liebevollem und ehrendem Gedenken gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Sjögren-Syndrom	3
2.2 Geschichte	4
2.3 Definition	4
2.4 Epidemiologie	5
2.5 Klinik	5
2.6 Diagnostische Kriterien	6
2.7 Pathogenese	9
2.8 Experimentelle Modelle	11
2.8.1 Spontane SS-Modelle	12
2.8.2 Non-Obese Diabetic (NOD)-Maus	12
2.9 Markeranalyse	15
2.9.1 Entzündungszellen	15
2.9.2 Proliferation und Apoptose	19
2.9.3 Matrix-Metalloproteinasen	21
2.9.4 Zytokine	22
2.10 Aufgabenstellung und Zielsetzung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Lippen Schleimhautbiopsien	25
3.1.2 Patientendaten	25
3.1.3 Versuchstiere	26
3.1.4 Verwendete Geräte	26
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	27
3.1.6 Chemikalien	27
3.1.7 Puffer und Lösungen	28
3.1.8 Antikörper	29
3.2 Methoden	31
3.2.1 Probenpräparation	31
3.2.2 Glucosebestimmung	31
3.2.3 Histologische Färbungen	32

3.2.4 Immunhistochemische Färbungen	32
3.2.5 Bewertung der histologischen Befunde	34
3.3 Statistische Auswertung	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Untersuchungen der Lippenbiopsien von Patienten mit Sjögren-Syndrom	35
4.1.1 Patienten	35
4.1.2 Paraklinik	35
4.1.3 Klinik	36
4.1.4 Bewertung der Entzündung	37
4.1.5 Zelluläres Infiltrat	38
4.2 Untersuchungen am Modell der NOD-Maus	44
4.2.1 Entzündung der submandibularen Speicheldrüsen	45
4.2.2 Zelluläres Infiltrat und Zytokine	50
5 Diskussion	54
5.1 Patientendaten	54
5.1.1 Klinik und Paraklinik	54
5.1.2 Entzündung und zelluläre Infiltration	55
5.2 NOD-Mäuse	56
5.2.1 Entzündung und zelluläre Infiltration	56
5.2.2 Bedeutung der Zytokine	57
5.2.3 Die besondere Rolle von IL-7	59
5.2.4 Rolle der Epithelzellen	62
5.2.5 Einfluss des Geschlechts	64
5.3 Pathogenesekonzept	65
5.4 Schlussfolgerungen	67
6 Literaturverzeichnis	69
7 Anlagen	89
7.1 Ehrenwörtliche Erklärung	89
7.2 Danksagung	90
7.3 Lebenslauf	91

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
ANA	Antinukleärer Antikörper
ANF	Antinukleärer Faktor
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BAFF	B cell activating factor
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle
DNA	Deoxyribonucleic acid
Fas	Fatty acid synthase
FasL	Fatty acid synthase ligand
Idd	Insulin-dependent diabetes
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA
NK	Natural killer
NOD	Non-obese diabetic
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NZB	New Zealand Black
NZW	New Zealand White
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pSS	primäres Sjögren-Syndrom
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonucleic acid
SLE	Systemischer Lupus erythematoses

SS	Sjögren-Syndrom
sSS	sekundäres Sjögren-Syndrom
SCID	Severe combined immunodeficiency
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
T1D	Typ 1-Diabetes
TIMP	Tissue inhibitor of MMPs
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TUNEL	Terminale deoxyribosyl-transferase mediated dUTP nick end labeling

## 1 Zusammenfassung

Das Sjögren-Syndrom (SS) ist eine häufige chronisch-entzündliche Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis. Das Krankheitsbild ist durch eine Entzündung der Tränen- und Speicheldrüsen mit fortschreitender Schädigung des Drüsengewebes und verminderter Sekretproduktion sowie den nachfolgenden klinischen Leitsymptomen in Form von Augen- und Mundtrockenheit (Sicca-Symptomatik) gekennzeichnet. Das Sjögren-Syndrom kann primär auftreten (pSS) oder wird im Rahmen anderer entzündlich-rheumatischer oder autoimmuner Erkrankungen diagnostiziert (sekundäres SS, sSS). Charakteristisch ist die lymphozytäre Infiltration der exokrinen Drüsen. Die Pathogenese des Sjögren-Syndroms ist trotz zahlreicher Untersuchungen weiterhin unklar. Eine kausale Therapie der Erkrankung existiert nicht. Ziel der Arbeit war die histologische Charakterisierung der Entzündungsreaktion in den Speicheldrüsen von Patienten mit primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom und im Modell der NOD-Maus. Untersucht wurden die kleinen Speicheldrüsen aus Lippenbiopsien von 16 Patienten mit gesicherter Sicca-Symptomatik, welche an Hand der Krankenakten dem pSS (n=11) und dem sSS (n=5) zugeordnet werden konnten. Bei der Aufarbeitung der Biopsien waren die typischen Lymphozyteninfiltrationen, teilweise mit Focusbildung nachweisbar, ebenso ein fibrotischer Umbau des Drüsengewebes. Dabei wurden keine Unterschiede in der Schwere der Entzündung und Fibrose zwischen primärer und sekundärer Erkrankung gefunden, gegenüber den Proben der Kontrollgruppe waren die Veränderungen aber signifikant stärker ausgeprägt. Die Analyse der Gewebsdestruktion über die Stärke der Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 zeigte ebenfalls nur gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede. Im Gewebe der Erkrankten waren erhöhte Apoptose- und Proliferationsprozesse nachweisbar. Eine histologische bzw. immunhistochemische Unterscheidung von primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom anhand der geprüften Marker war somit nicht möglich. Die Diagnosestellung eines Sjögren-Syndroms und die Differenzierung zwischen primärer und sekundärer Variante können nur durch die Einbeziehung der entsprechenden klinischen Klassifikationskriterien erfolgen.

Da die Lippenbiopsien retrospektiv aus einem recht inhomogenen Kollektiv stammten und vorwiegend nur geringe bis mäßige Veränderungen nachweisbar waren, wurden weitere Untersuchungen am Modell der NOD-Maus durchgeführt. Dabei sollten besonders auch frühe Phasen der Erkrankung erfasst werden. Untersucht wurden



histologische Präparate von submandibularen Speicheldrüsen von insgesamt 70 männlichen und weiblichen NOD-Mäusen aus 4 verschiedenen Altersgruppen, von 6, 12, 24 und 36 Wochen alten Tieren. Pro Altersgruppe und Geschlecht wurden mindestens 6 Tiere analysiert. Sjögren-Syndrom-ähnliche histologische Veränderungen, wie inflammatorische Infiltration mit Follikelbildung und Destruktion des Drüsengewebes, waren in allen untersuchten Tieren ab der 12. Woche nachweisbar. Während Frauen deutlich häufiger als Männer am Sjögren-Syndrom erkranken (Verhältnis 9:1), zeigte sich im Modell der NOD-Maus eine frühere und stärkere Infiltration und Schädigung der Drüsen bei den männlichen Tieren. Somit ist die geschlechtsspezifische weibliche Dominanz der Erkrankung zumindest an diesem Modell nicht nachvollziehbar. Im histopathologischen Bild der entzündeten Speicheldrüsen dominieren die lymphozytären Infiltrate mit fokaler Ansammlung, besonders entlang der Ausführungsgänge der Drüsen. Die Infiltrate bestehen vorwiegend aus T-Zellen (ca. 70%) und B-Zellen/Plasmazellen (ca. 20%) sowie wenigen Makrophagen. Bei den T-Zellen handelt es sich zumeist um CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Im Verlauf der Erkrankung nahmen außerdem die Apoptose- und Proliferationsraten deutlich zu.

Aufgrund der aktuellen Bedeutung der Zytokine IL-7 und IL-17 bei der Induktion und Progression von Entzündungsreaktionen und in verschiedenen Autoimmunmodellen haben wir die Expression dieser Zytokine in submandibularen Speicheldrüsen der NOD-Mäuse immunhistochemisch erfasst. Auf diese Weise konnten wir zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-17 im Verlauf der SS-Entwicklung in geringen Mengen bereits sehr zeitig im Drüsenstroma und in Epithelzellen der Drüsengänge nachweisbar ist. Bei 24 und 36 Wochen alten Tieren wurde IL-17 dann verstärkt auch in den zellulären Infiltraten gefunden. IL-7, ein Zytokin, das besonders für die Differenzierung und Homöostase des T-Zell-Kompartiments wichtig ist, konnte bereits bei 6 Wochen alten Tieren in geringen Mengen im Drüsenstroma nachgewiesen werden und stieg danach bis zur 24. Woche an, bei männlichen Tieren stärker als bei Weibchen. Der frühe Nachweis von IL-7 in den Speicheldrüsen der NOD-Mäuse, bereits bevor die zelluläre Infiltration beginnt, lässt eine wichtige Funktion dieses Zytokins bei der Induktion der inflammatorischen Kaskade annehmen. Seine Fähigkeit, epitheliale Zellen zu aktivieren, unterstreicht darüber hinaus die besondere Bedeutung der glandulären Epithelzellen in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms.

## 2 Einleitung

### 2.1 Sjögren-Syndrom

Das Sjögren-Syndrom (SS) gehört als häufige chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung der exokrinen Drüsen zu den Krankheitsbildern des rheumatischen Formenkreises, wobei die klinischen Entitäten des entzündlichen Rheumatismus vielfältig und häufig überlappend sind. Das Krankheitsbild ist durch eine chronische Entzündung der Tränen- und Speicheldrüsen mit fortschreitender Schädigung des Drüsengewebes und verminderter Sekretproduktion sowie die nachfolgenden klinischen Leitsymptome Augen- und Mundtrockenheit (Sicca-Symptomatik) gekennzeichnet. Trotz einer zunehmenden Zahl aktueller Befunde zu den zugrunde liegenden Mechanismen ist die Ursache der Erkrankung bisher unbekannt. Die Behandlung erfolgt deshalb überwiegend symptomatisch, eine kausale Therapie oder Heilung ist zurzeit nicht möglich (Reviews: Fox 2005, Feist et al. 2007, Becker et al. 2010, Hansen & Dörner 2010, Nocturne & Marietta 2013, Mavragani & Moutsopoulos 2014).

Histologisch ist die Lymphozyteninfiltration der betroffenen Drüsen charakteristisch, die bis hin zur völligen Zerstörung und zum Funktionsverlust der exokrinen Drüsen führen kann (Krenn et al. 2010). Das Sjögren-Syndrom kann primär auftreten (primäres SS), tritt aber oft auch im Zusammenhang mit anderen entzündlich-rheumatischen oder autoimmunen Erkrankungen auf (sekundäres SS), z.B. bei Rheumatoider Arthritis (RA), systemischem Lupus erythematoses (SLE), progressiver Sklerodermie, Polymyositis oder Dermatomyositis.

Bei 80-90% der Patienten lassen sich im Serum antinukleäre Antikörper (ANA) und Rheumafaktoren (RF) nachweisen, Autoantikörper gegen die ribonukleoproteinerigen Antigene Ro/SS-A (Sjögren-Syndrom-Antigen A) und/oder La/SS-B (Sjögren-Syndrom-Antigen B) werden bei 50-90% der Betroffenen gefunden, sind allerdings auch nicht krankheitsspezifisch, sondern treten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen auf, insbesondere beim SLE (Routsias & Tzioufas 2010).

Die exakte Diagnose der Erkrankung Sjögren-Syndrom dauert vom ersten Arztbesuch an häufig über 10 Jahre und ist oft mit einem langen Leidensweg der Patienten sowie zahlreichen, insbesondere verharmlosenden Arbeitsdiagnosen verbunden.

## **2.2 Geschichte**

Der schwedische Augenarzt Henrik Sjögren (1899-1986) beschrieb 1933 in seiner Dissertation den klinischen und histologischen Befund von 19 Frauen mit Xerostomie und Keratokonjunktivitis sicca, 13 der betroffenen Patientinnen litten außerdem unter chronischer Arthritis (Sjögren 1933).

Bereits 1888 hatte Johann Mikulicz-Radecki die Kasuistik eines 42 Jahre alten Mannes mit symmetrisch vergrößerten Tränen- und Speicheldrüsen (Mikulicz-Syndrom) beschrieben (Mikulicz-Radecki 1892). Über weitere Fälle berichteten Henri Gougerot (1925) und Adriaan Houwer (1926). Morgen und Castlemen (1953) stellten dann auf Grund der histologischen Gemeinsamkeiten den Zusammenhang zwischen dem Sjögren-Syndrom und dem Mikulicz-Syndrom dar. Beim Mikulicz-Syndrom sind allerdings die Autoimmunreaktionen und auch die funktionellen Defekte deutlich geringer ausgeprägt (Yamamoto et al. 2005).

## **2.3 Definition**

Eine gewisse Problematik ergab sich aus den weltweit unterschiedlichen Diagnosekriterien, welche die eindeutige Zuordnung der Symptome erschwerten. Desweiteren finden sich multiple extraglanduläre Manifestationen des SS, die zu einer Verschleierung des Krankheitsbildes bzw. zu Fehlinterpretationen führen können. Aus klinischer Sicht findet man neben der bekannten Exokrinopathie (Sicca-Symptomatik) auch die Einbeziehung verschiedener anderer Organe, was den systemischen Charakter der Erkrankung unterstreicht (Kassan & Moutsopoulos 2004). So werden bei bis zu 50% der Patienten Manifestationen an Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Blutgefäßen, Haut, Gehirn, Muskeln, Gelenken u.a. beschrieben. Bloch et al. (1965) schlugen die Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom vor, wobei die Differenzierung vom Vorhandensein einer weiteren Kollagenose oder Autoimmunerkrankung abhängt, d.h. beim primären Sjögren-Syndrom findet sich keine weitere Erkrankung, während dies beim sekundären Sjögren-Syndrom der Fall ist.

Nach verschiedenen Klassifikationsvorschlägen, wie auch den Kopenhagener-Kriterien 1975/76, wurden 2002 durch die Amerikanisch-Europäische Konsensusgruppe vereinheitlichte Kriterien als Standard definiert sowie klare Regeln für die Klassifizierung von Patienten mit primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom

erstellt (Vitali et al. 2002), die inzwischen weiter aktualisiert wurden (Seror et al. 2010, 2011, Rasmussen et al. 2013, Vitali et al. 2013).

## **2.4 Epidemiologie**

In verschiedenen Veröffentlichungen aus dem amerikanischen Raum wird das SS als zweithäufigste Autoimmunerkrankung eingestuft (Fox 2005). In den USA schätzt man 500.000 bis 2 Millionen Erkrankte. Daten aus anderen Ländern zeigen eine Prävalenz von 0,02% in Japan und bis 4,8% in Griechenland, so dass das SS teilweise als häufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung angenommen wird. In Deutschland geht man von einer Prävalenz von mindestens 0,4% der erwachsenen Bevölkerung aus, damit ist das SS nach der RA die zweithäufigste entzündlich-rheumatische Erkrankung (Westhoff & Zink 2010).

Die unterschiedlichen Angaben in der Literatur bezüglich Prävalenz und Inzidenz des SS sind auch auf die vormals verschiedenen Klassifikationskriterien zurückzuführen. Weitere Verzerrungen ergeben sich aus den unterschiedlichen Arztkonsultationen der Patienten. Die meisten Betroffenen befinden sich primär in augen- oder zahnärztlicher Behandlung, in seltenen Fällen und nur bei ausgeprägten extraglandulären Symptomen werden Internisten oder Rheumatologen frühzeitig mit einbezogen. Schätzungen zufolge sollen etwa 40% der über 60-Jährigen mit einer Xerostomie an einem SS leiden. In allen Populationen sind 9 von 10 Patienten Frauen, nach neueren Daten sind Frauen sogar 10-20-mal häufiger betroffen als Männer (Manthorpe et al. 2002), wobei sich der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung um das 5. Lebensjahrzehnt, also postmenopausal, befindet.

## **2.5 Klinik**

Die Hauptsymptome des SS finden sich an Augen und Mund der Erkrankten. So klagen die Patienten über trockene schmerzende Augen und Fremdkörpergefühl. Klinisch finden sich ein verminderter Tränenfluss und in der Folge ein Abreißen des Tränenfilmes über der Cornea. Dadurch reiben die Augenlider auf der Hornhaut und erzeugen dort feine Rillen (filamentäre Keratitis). Hornhautödeme und Konjunktivitiden sind die Folge. Der Symptomkomplex findet seinen Ausdruck in einer Keratokonjunktivitis sicca. Durch die erhöhte Entzündungsbereitschaft der Augenlider kann außerdem häufig eine Blepharitis diagnostiziert werden. Im Mundbereich dominieren Entzündungen der großen Speicheldrüsen und der akzessorischen

labialen Speicheldrüsen. Wegen der eingeschränkten Speichelproduktion und der nachfolgenden Mundtrockenheit (Xerostomie) leiden die Betroffenen unter Geschmacks- und Geruchsstörungen und haben Schwierigkeiten beim Schlucken, insbesondere von fester oder trockener Nahrung. Malnutrition und Karies sowie Infektionsanfälligkeit im Mundraum können Hinweise für solche Prozesse sein.

Etwa 50% der SS-Patienten erleiden zusätzlich pulmonale, renale oder hepatische Organbeteiligungen. Folgende Befunde können als extraglanduläre Manifestation des Sjögren-Syndroms auftreten: chronische Bronchitis, interstitielle Pneumonie, pulmonale Hypertension, Dysphagie, atrophische Gastritis, diffuse Lebererkrankungen, Hautrockenheit, Raynaud-Phänomen, Vaskulitis, Hypergammaglobulinämie, Thyreoiditis, periphere Neuropathie, Myalgien, tubulointerstitielle Nephritis, Glomerulonephritis, Amyloidose, obstruktive Nephropathie, Anämie und Thrombozytopenie. Bei ca. 5% der Erkrankten mit primärem Sjögren-Syndrom kommt es zur Entwicklung maligner Lymphome, besonders von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) der B-Zell-Reihe (Fox 2005, Hansen et al. 2007).

**Tabelle 1.** Häufige Symptome und extraglanduläre Manifestationen beim Sjögren-Syndrom (Willeke 2002, Ramos-Casals et al. 2008)

Manifestation/Symptom	Prävalenz in %
Leistungsinsuffizienz	50-75
Arthralgien/Arthritis	50-60
Raynaud-Phänomen	20-40
Myalgien	5-50
Polyneuropathie	5-40
Interstitielle Nephritis	5-20
Kutane Vaskulitis	10
Interstitielle Lungenerkrankung	10
Leberbeteiligung	5-10
Lymphome	5-8

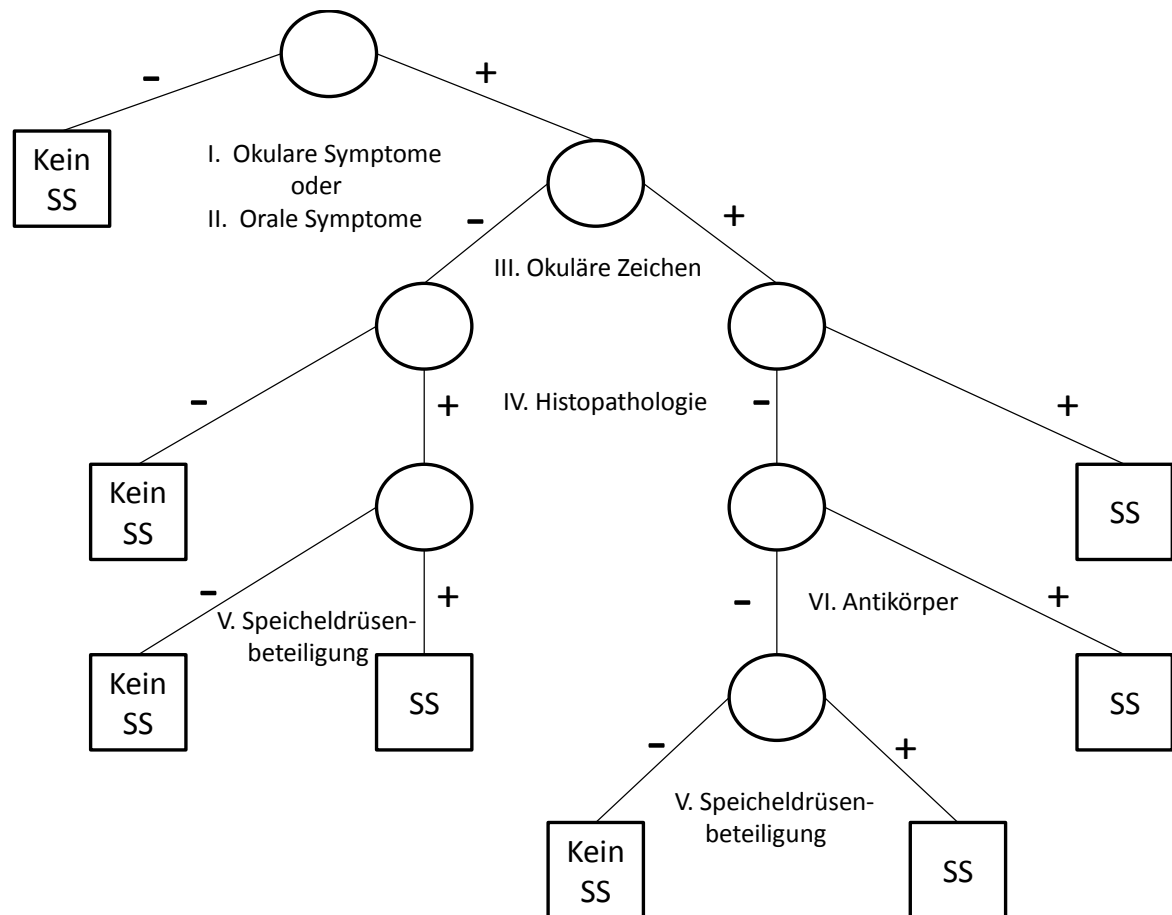
## 2.6 Diagnostische Kriterien

Zur Vereinfachung und Verbesserung der Diagnose wurde im internationalen Konsens die Festlegung von Klassifikationskriterien vereinbart (Tab. 2, Abb. 1). Vier der sechs angeführten Kriterien müssen erfüllt sein, um die Diagnose Sjögren-

Syndroms erstellen zu können. Außerdem erfolgt die Abgrenzung zur Sicca-Symptomatik bei anderen Erkrankungen.

**Tabelle 2.** Europäisch-amerikanische Klassifikationskriterien des Sjögren-Syndroms (Vitali et al. 2002, Gromnica-Ihle 2007)

Kriterium	Parameter
Anwendungsregel	
I. Okuläre Symptome (1 positive Antwort auf mindestens 1 der Fragen)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hatten Sie in den letzten 3 Monaten täglich anhaltende, unangenehme trockene Augen?</li> <li>2. Haben Sie ein wiederkehrendes Sandkorn- oder Fremdkörpergefühl in den Augen?</li> <li>3. Verwenden Sie häufiger als 3-mal täglich künstliche Tränenflüssigkeit?</li> </ol>
II. Orale Symptome (1 positive Antwort auf mindestens 1 der Fragen)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hatten Sie in den letzten 3 Monaten täglich das Gefühl eines trockenen Mundes?</li> <li>2. Hatten Sie im Erwachsenenalter wiederholt oder anhaltend Speicheldrüsenschwellungen?</li> <li>3. Trinken Sie regelmäßig, um trockene Speisen schlucken zu können?</li> </ol>
III. Okuläre Zeichen (1 positive Antwort auf mindestens 1 der Fragen)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Schirmertest (ohne Anästhesie) &lt; 5mm/5min</li> <li>2. Rose-Bengalen- oder anderer Farbstoffscore pathologisch (<math>\geq 4</math> im Van-Bijsterveld-Score)</li> </ol>
IV. Histopathologie	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fokale lymphozytäre Sialadenitis mit einem Focusscore <math>\geq 1</math>, definiert als die Zahl der Lymphozytenfoci (<math>\geq 50</math> Lymphozyten) pro 4 mm<sup>2</sup> Drüsengewebe</li> </ol>
V. Speicheldrüsenbeteiligung (mindestens 1 positiver Test)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Unstimulierter Speichelfluss <math>\leq 1,5</math> ml/15 min</li> <li>2. Sialografie mit diffuser Sialektasie ohne Anhalt für eine Destruktion der Hauptdrüsengänge</li> <li>3. Speicheldrüsenszintigrafie mit verzögerter Nuklidaufnahme, reduzierter Speicherung und/oder verlängerter Ausscheidung</li> </ol>
VI. Autoantikörper	Serologischer Nachweis von Anti-SS-A (Ro)- und/oder Anti-SS-B (La)-Antikörper
Primäres Sjögren-Syndrom	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 4 von 6 Kriterien erfüllt, sofern entweder das Kriterium IV (Histopathologie) oder VI (Autoantikörper) positiv ist</li> <li>2. 3 von 4 objektiven Kriterien (III, IV, V, VI) erfüllt sind</li> <li>3. Die Einstufung mittels Klassifikationsbaum erfolgen kann (Abb. 1)</li> </ol>
Sekundäres Sjögren-Syndrom	Bei assoziierter Erkrankung, wenn die Kriterien I und II sowie 2 der objektiven Kriterien III, IV und V erfüllt sind (Tab. 2)
Ausschlusskriterien	Zustand nach Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich, Hepatitis-C-Infektion, AIDS, vorbestehendes Lymphom, Sarkoidose, Graft-vs-host-Reaktion, Einnahme von anticholinerg wirksamen Medikamenten während einer Zeit < 4 Halbwertszeiten vor Begutachtungszeitpunkt



**Abb. 1.** Klassifikationsbaum des SS, modifiziert nach Vitali et al. (2002)

Besonders wichtig ist ein positiver histologischer Nachweis und/oder der Nachweis von entsprechenden Autoantikörpern. Die Häufigkeit der Sicca-Symptomatik bzw. eines sekundären Sjögren-Syndroms bei anderen Erkrankungen ist in Tabelle 3 angeführt.

**Tabelle 3.** Häufigkeit des sekundären Sjögren-Syndroms (nach Dörner et al.1998)

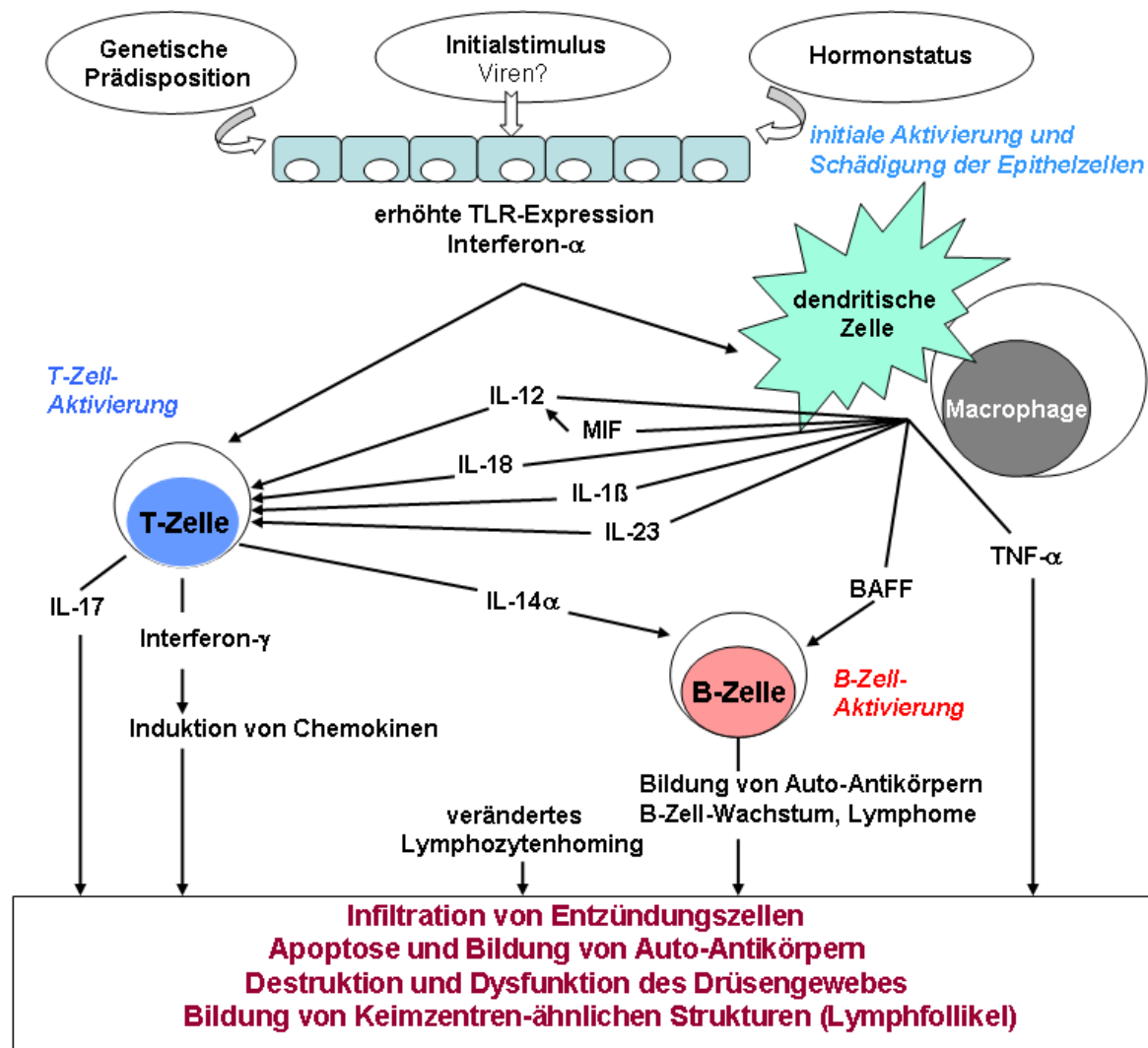
Erkrankung	Frequenz in %
Systemischer Lupus erythematodes	15-36
Rheumatoide Arthritis	20-32
Sklerodermie	11-24
Dermato-/Polymyositis	9-18
Primär biliäre Zirrhose	8-15

## 2.7 Pathogenese

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie des Sjögren-Syndroms nach wie vor ungeklärt und werden die Pathogeneseprozesse bisher nur teilweise verstanden. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen wird eine multifaktorielle Genese angenommen, wobei Umweltfaktoren bei genetisch prädisponierten Individuen als Auslöser fungieren könnten (Reviews: Fox 2005, Becker et al. 2010, Hansen & Dörner 2010, Witte 2010, Mavragani & Moutsopoulos 2014). Als Umweltfaktoren könnten virale Infektionen oder auch andere Infektionen wirken, die zur Aktivierung und Schädigung der glandulären Epithelien führen und das MHC-unabhängige angeborene Immunsystem aktivieren (Kassan & Moutsopoulos 2004). Im experimentellen Modell der NOD-SCID-Maus konnten solche Veränderungen bereits vor der Infiltration von Lymphozyten beobachtet werden (Robinson et al. 1996). Am komplexen Pathogeneseprozess sind wahrscheinlich verschiedene Mechanismen beteiligt (Abb. 2). Die erhöhte Apoptoserate und Nekrosen in den epithelialen Zellen der Drüsen führen zur Freisetzung von Zytoskelettproteinen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Fodrin), die als Neoantigene das Autoimmungeschehen initiieren können (Routsias & Tzioufas 2010). Bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems werden Toll-like-Rezeptoren (TLR) exprimiert, die konservierte molekulare Muster erkennen, sogenannte PAMP (pathogen-associated molecular pattern), die von vielen Mikroorganismen und Apoptoseprodukten getragen werden (Takeda et al. 2003). Dadurch kommt es zur Freisetzung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die direkt die Wanderung von Lymphozyten in das Drüsengewebe bewirken. In den Drüsen interagieren die Lymphozyten mit dendritischen Zellen (DCs) und epithelialen Zellen (Jonsson et al. 2003), was zur MHC-abhängigen Aktivierung von T- und B-Zellen mit lokaler Produktion von Zytokinen, Autoantikörpern und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) führt. Dadurch wird die Dysfunktion der Drüsen eingeleitet, die bis hin zur völligen Destruktion führen kann (Fox 2005). Eine wesentliche Rolle spielen dabei die B-Zellen und Plasmazellen, die in enger Kooperation mit T-Zellen, DCs und Drüsenepithelien offenbar maßgeblich zum Destruktionsprozess beitragen (Robinson et al. 1998a). Sie produzieren Autoantikörper gegen die spezifischen Antigene SS-A/Ro und SS-B/La, gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fodrin und gegen den muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor (Gottenberg et al. 2006) sowie antinukleäre Autoantikörper (ANA) und Rheumafaktoren (RF), die bei ca. 60% der SS-Patienten auftreten. Die erhöhte Proliferation und Aktivierung der B-Zellen wird durch eine



verstärkte Produktion des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF unterstützt und führt zur Hypergammaglobulinämie, zur oligoklonalen Proliferation, Produktion von Autoantikörpern und Bildung von Keimzentren-ähnlichen Strukturen (Lymphfollikel). Diese abnorme B-Zell-Aktivierung kann auch zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen führen, was bei ca. 5% der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom beobachtet wird (Abb. 2).



**Abb. 2.** Potentielle Mechanismen der Immunpathogenese des Sjögren-Syndroms, modifiziert nach Becker et al. (2010).

BAFF, B cell activating factor; IL, interleukin; MIF, macrophage migration inhibitory factor; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

Im histopathologischen Bild der entzündeten Speicheldrüsen dominieren die lymphozytären Infiltrate mit fokaler Ansammlung, besonders entlang der Ausführungsgänge der Drüsen. Die Infiltrate bestehen vorwiegend aus CD4<sup>+</sup> T-Helfer (Th)-Zellen (ca. 70%) und B-Zellen/Plasmazellen (ca. 20%) sowie wenigen

Makrophagen und dendritischen Zellen (Fox & Kang 1992, Kassan & Moutsopoulos 2004, Krenn et al. 2010). Diese Zellen sind für die lokale Produktion von Zytokinen wie Interferone (IFN), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Roescher et al. 2009, 2010) sowie Immunglobulinen und Autoantikörpern verantwortlich (Reviews: Dörner et al. 2002, Hansen et al. 2007a, 2010, Mavragani & Moutsopoulos 2014). Durch das enge lokale Zusammenspiel von Elementen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems, deren Aktivierung und Bildung von Autoantikörpern wird anscheinend in genetisch prädisponierten Personen der Circulus vitiosus einer chronisch-entzündlichen Reaktion in den Speicheldrüsen und anderen exokrinen Drüsen (Tränendrüsen) induziert und aufrechterhalten (Abb. 2).

## **2.8 Experimentelle Modelle**

Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen ist auch beim Sjögren-Syndrom die Ätiologie noch immer unbekannt und die Pathogenesemechanismen sind nur unvollkommen geklärt. Die klinischen Symptome entwickeln sich erst relativ spät, es gibt keine eindeutigen diagnostischen Kriterien und diagnostische Tests zur Früherfassung der Erkrankung fehlen völlig, so dass frühe präklinische Phasen der Krankheitsentwicklung beim Patienten selbst kaum untersucht werden können. Aus diesem Grunde spielen experimentelle Tiermodelle des SS eine wichtige Rolle. Wegen der Komplexität und Heterogenität des SS gibt es zwar kein Tiermodell, welches das volle Krankheitsbild beim Menschen widerspiegelt, Untersuchungen an Modellen haben aber ganz wesentlich zur Aufklärung von Mechanismen der Pathogenese beigetragen, besonders hinsichtlich spezifischer molekularer Mechanismen, die für die Entwicklung der Krankheit verantwortlich sind (Reviews: van Blokland & Versnel 2002, Chiorini et al. 2009, Delaleu et al. 2011). Trotz der erheblichen Unterschiede zum Menschen, besonders was Entwicklung, Fertilität und Lebensdauer betrifft, haben sich Mausmodelle als besonders geeignet herausgestellt. Wichtig dafür sind wahrscheinlich die doch relativ großen Übereinstimmungen im gesamten Genom (nur ca. 300 Gene sind unterschiedlich) und besonders auch in grundlegenden Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität (Mestas & Hughes 2004). Ein weiterer wichtiger Vorteil der Mausmodelle ist, dass inzwischen eine Vielzahl von Inzuchtstämmen und genetisch modifizierten Stämmen existieren, bei denen bestimmte Gene ausgeschaltet

(Knockout-Mäuse) oder eingeführt wurden (transgene Mäuse). Mit solchen Modellen kann die Rolle einzelner Moleküle (Entzündungsfaktoren wie Zytokine und Chemokine, Enzyme, Signaling- und Transkriptionsfaktoren usw.) im Pathogenese-prozess gezielt und detailliert aufgeklärt werden. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass die Entwicklung der zurzeit wirksamsten Medikamente, die bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, die sog. Biologicals, in experimentellen Tiermodellen erfolgt ist (Bevaart et al. 2010).

### 2.8.1 Spontane SS-Modelle

Bei verschiedenen Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen kann es im Laufe der Entwicklung auch zu Entzündungen der exokrinen Drüsen einschließlich der submandibularen Speicheldrüsen (Sialoadenitis) kommen, so z.B. bei der F1-Generation von New Zealand Black- mit New Zealand White-Mäusen [(NZB/NZW)F1], bei denen eine SLE (systemischer Lupus erythematoses)-ähnliche Erkrankung mit zahlreichen Autoimmunreaktionen entsteht (Jonsson et al. 1987). Interessanterweise kann dabei das Entzündungsgeschehen und der Funktionsverlust der Speicheldrüsen durch einen unspezifischen Entzündungsstimulus, z.B. durch intraperitoneale Injektion von inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Deshmukh et al. 2008) oder durch Depletion der regulatorischen T-Zellen (Hayashi et al. 2009) massiv verstärkt werden. Insgesamt handelt es sich bei diesem Modell aber doch eher um ein Modell des sekundären SS, weil die Erkrankung der Speicheldrüsen die Folge eines komplexen Autoimmungeschehens ist. Dies trifft in ähnlicher Weise auch für MRL/lpr-Mäuse zu, die ebenfalls eine SLE-ähnliche Erkrankung mit zahlreichen Autoimmunreaktionen bekommen (Andrews et al. 1978, Hang et al. 1982, Tanaka et al. 1988). Die Entzündungen der kleinen Speicheldrüsen sind dabei die Folge eines Defektes der Apoptosemechanismen in den lymphoiden Organen und in den Speicheldrüsen selbst (Skarstein et al. 1997).

### 2.8.2 Non-Obese Diabetic (NOD)-Maus

Das wichtigste, am intensivsten untersuchte Modell des Sjögren-Syndroms ist die NOD-Maus. Diese Mäuse entwickeln innerhalb von ca. 2 Monaten spontan einen Typ 1-Diabetes (T1D) mit Entzündungen der Langerhans-Inseln im Pankreas und zunehmendem Insulinmangel (Reviews: Anderson & Bluestone 2005, Driver et al. 2011). Darüber hinaus treten in zahlreichen Organen und Geweben entzündliche

Veränderungen mit Entwicklung von fokalen Lymphozytenaggregaten auf, so z.B. auch in den Speicheldrüsen (Review: Cha et al. 2002a). Während sich der T1D streng auf der Basis einer MHC Klasse II-Abhängigkeit (H2<sup>97</sup>) entwickelt (Anderson & Bluestone 2005), können die SS-ähnlichen Veränderungen auch auf einem anderen genetischen Hintergrund entstehen. NOD.B10-H2<sup>b</sup>-Mäuse entwickeln z.B. SS-ähnliche Veränderungen, bekommen aber keinen Diabetes (Robinson et al. 1998c). Das bedeutet, dass der H2-Haplotyp keinen direkten Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung der Speicheldrüsen hat bzw. dass sich die zwei verschiedenen Erkrankungen unabhängig voneinander entwickeln. Inzwischen konnten 20 chromosomale Genloci identifiziert werden, die bei der Entstehung des Diabetes eine wichtige Rolle spielen (*Idd*, insulin-dependent diabetes), und zwei von denen – *Idd3* und *Idd5* – sind für die Entwicklung der SS-Veränderungen in den Speichel- und Tränendrüsen verantwortlich (Brayer et al. 2000). Durch den Transfer dieser Genloci in nicht-susceptible C57BL/6-Mäuse können in den Empfängertieren (C57BL/6. NOD<sup>Aec1Aec2</sup>-Mäuse) SS-ähnliche Veränderungen in den Speicheldrüsen induziert werden, ohne dass die Tiere an Diabetes erkranken (Cha et al. 2002b, Nguyen et al. 2006b).

Die histologischen Veränderungen in den Speicheldrüsen beginnen nach etwa 8 Wochen und sind durch Infiltration von Entzündungszellen mit fokaler Ansammlung gekennzeichnet. Die Struktur und zelluläre Zusammensetzung dieser Foci ähnelt denen, die in den Speicheldrüsen von SS-Patienten vorkommen (Review: Voulgarelis & Tzioufas 2010). Die Aktivierung epithelialer und dendritischer Zellen im Drüsengewebe wird für das Einwandern und die Akkumulation von Entzündungszellen verantwortlich gemacht (van Blokland et al. 2000, Wildenberg et al. 2009). In den fokalen Infiltraten dominieren T-Zellen und eine geringere Zahl an B-Zellen sowie einzelne Makrophagen, NK-Zellen und dendritische Zellen. Zuerst infiltrieren dabei CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, später kommen die anderen mononukleären Zellen hinzu, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen (Robinson et al. 1998a). Außerdem kommt es zur Atrophie der azinären Epithelzellen und zu einer fortschreitenden Fibrosierung des Drüsengewebes. In deren Folge kommt es zu Einschränkungen bis hin zum völligen Verlust der Funktion bestimmter exokriner Drüsen, besonders der Speicheldrüsen. Charakteristisches Merkmal dafür ist eine verringerte Speichelproduktion (Hyposalivation). Ein direkter Zusammenhang zwischen Grad der Entzündung und reduziertem Speichelfluss ist zwar nicht eindeutig belegt, die Entzündung geht aber

dem funktionellen Defekt voraus (Jonsson et al. 2006). Eine umfangreiche Analyse der Entzündung und der Funktion der Speicheldrüsen sowie zahlreicher Biomarker (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, kostimulatorische Moleküle, Immunglobuline etc.) in Speichel und Serum von 21 Wochen alten NOD-Mäusen konnte auch keine eindeutigen Korrelationen zwischen bestimmten Markern und den funktionellen Defekten aufzeigen (Delaleu et al. 2008). Prozesse des adaptiven Immunsystems, besonders vom T-Helferzellen Typ 2 (Th2), sind anscheinend in die Entwicklung des Sjögren-Syndroms mit einbezogen, ein signifikanter Zusammenhang wurde aber nicht gefunden. Allerdings könnte der Zeitpunkt 21 Wochen auch zu spät sein, um wichtige pathogenetische Zusammenhänge aufklären zu können. Erhöhte Fas/FasL-vermittelte Apoptoseraten in den epithelialen Zellen könnten dabei eine wichtige Rolle bei der Induktion des Entzündungsgeschehens und der Gewebsdestruktion spielen, während die Hemmung der Apoptosemechanismen in Lymphozyten zur Proliferation und Akkumulation der Zellen führt (Kong et al. 1998).

B-Zellen infiltrieren erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung die Speicheldrüsen und können somit kaum direkt an der Induktion beteiligt sein. Das konnte auch in NOD.Igμ<sup>null</sup> Mäusen gezeigt werden, denen funktionelle B-Zellen fehlen (Robinson et al. 1998b). Diese Mäuse entwickeln progressive histopathologische Läsionen in den Speicheldrüsen mit fokaler Ansammlung von T-Zellen, es kommt aber nicht zum Funktionsverlust der Drüsen und auch nicht zur Entwicklung eines Diabetes. Dies lässt den Schluss zu, dass von B-Zellen produzierte Autoantikörper für die Beeinträchtigung der sekretorischen Funktion mitverantwortlich sind. Wie bei SS-Patienten treten auch bei NOD-Mäusen verschiedene Autoantikörper auf, die oft gegen Bestandteile des Zellkerns, des Zytoplasmas oder gegen Oberflächenproteine gerichtet sind (Review: Delaleu et al. 2011). So kommt es auch zur Bildung von Autoantikörpern gegen den muskarinergen (M<sub>3</sub>) Rezeptor für Acetylcholin, der u.a. für die Speichelsekretion verantwortlich ist (Robinson et al. 1998b). In NOD-SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäusen, denen funktionelle T- und B-Zellen fehlen, kann mit solchen Antikörpern die Speichelsekretion gehemmt werden, was die pathophysiologische Bedeutung dieser Autoantikörper unterstreicht (Nguyen et al. 2000). Außerdem werden auch Autoantikörper gegen Ribonukleoproteine (Anti-SS-A/Ro, Anti-SS-B/La), gegen α-Fodrin und gegen bestimmte Zytoskelettproteine gebildet (Cha et al. 2002). Solche Autoantikörper könnten im Prozess der Apoptose

entstehen, indem bei der proteolytischen Spaltung kryptische Antigene oder Epitope freigesetzt werden. Die Annahme, dass die Autoantikörper an der Entwicklung der funktionellen Defekte beteiligt sind, wird durch die Hochregulation von Genclustern, die für die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen und für die Immunglobulinsynthese zuständig sind, unterstützt (Nguyen et al. 2009). Während bestimmte Gencluster der angeborenen Immunität bereits bei 8 Wochen alten NOD-Mäusen angeschaltet sind, werden B-Zell-assoziierten Gene erst ab einem Alter von 12 Wochen hoch reguliert, mit einem Maximum nach 16 und 20 Wochen. Dies entspricht ziemlich genau dem zeitlichen Verlauf der Infiltration und dem zunehmenden Funktionsverlust der Drüsen. In NOD-SCID-Mäusen wurden allerdings selektive Schädigungen des Drüsengewebes mit zunehmendem Funktionsverlust nachgewiesen, ohne dass bei diesen Tieren eine nachweisbare Lymphozyteninfiltration stattfindet (Robinson et al. 1996). Dies lässt vermuten, dass noch weitere, wahrscheinlich genetische Faktoren an der Induktion der Destruktionsprozesse direkt beteiligt sind. Die transgene Überexpression von BAFF (B cell activating factor), einem wichtigen Regulator der B-Zell-Entwicklung, unterstreicht allerdings wiederum die wichtige pathogenetische Rolle der B-Zellen. So konnten Groom et al. (2002) zeigen, dass BAFF-transgene C57BL/6-Mäuse eine SS-ähnliche Erkrankung mit schwerer Sialoadenitis, verringerter Speichelsekretion und Schädigung der Drüsenstrukturen entwickeln. Außerdem spielen Zytokine in der gesamten Pathogenese des Entzündungsgeschehens eine maßgebliche Rolle, auf die im Abschnitt 2.9.4 und in der Diskussion detailliert eingegangen wird.

## **2.9 Markeranalyse**

### **2.9.1 Entzündungszellen**

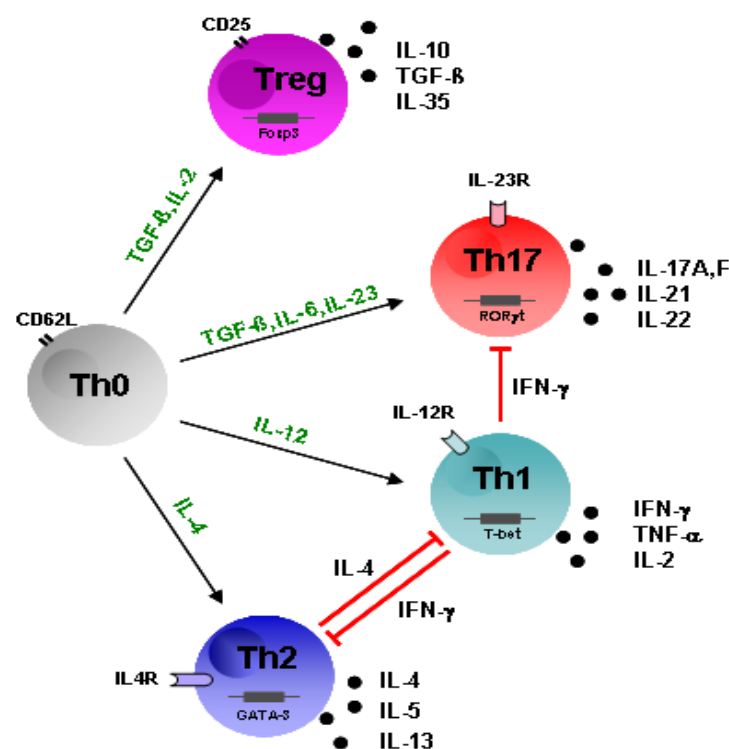
Das Entzündungsgeschehen in den Speicheldrüsen von SS-Patienten und im NOD-Modell ist durch die Einwanderung und Aktivierung von Lymphozyten mit fokalen Ansammlungen gekennzeichnet (Krenn et al. 2010). Dabei handelt es sich vorwiegend um T-Lymphozyten (ca. 70%) und etwa 20% sind B-Lymphozyten. T- und B-Zellen sind für die erworbene Immunität verantwortlich. Sie entwickeln sich aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. T- und B-Lymphozyten unterscheiden sich dabei durch ihre Antigenrezeptoren und den Ort, an dem sie ausdifferenzieren: T-Zellen reifen im Thymus und B-Zellen im Knochenmark. Gereifte T- und B-Lymphozyten

zirkulieren zwischen Blut und peripheren lymphatischen Geweben. B-Zellen differenzieren nach Kontakt mit einem Antigen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, während sich T-Zellen zu T-Effektorzellen mit einer Reihe verschiedener Funktionen entwickeln (Murphy et al. 2009).

T-Zellen erkennen Antigene, die sich auf Oberflächen von körpereigenen Zellen befinden. Dabei handelt es sich um Peptidfragmente, die von den Proteinen des Pathogens stammen, z.B. Viren, intrazellulären Bakterien oder pathogenen Produkten, die Zellen durch Endozytose aus der extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen haben. Spezialisierte Glykoproteine der Wirtszelle transportieren diese Proteine an die Zelloberfläche. Diese peptidbindenden Glykoproteine bezeichnet man als MHC-Moleküle, da ihre Kodierung durch einen Genkomplex erfolgt, der als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bezeichnet wird. Die Modifikation der Proteine wird als Antigenprozessierung bezeichnet und nach der Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche sind die T-Zellen in der Lage, den Komplex aus Peptid und MHC-Molekül zu erkennen.

Von den T-Zellen sind zwei wichtige Untergruppen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen bekannt. Sie lassen sich durch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 und durch die Klasse der MHC-Moleküle, an die sie binden, unterscheiden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, MHC Klasse I (MHC I) und MHC Klasse II (MHC II), die sich in ihrer Struktur und dem Expressionsmuster im Gewebe unterscheiden. MHC I-Moleküle befördern Peptide aus dem zytosolischen Kompartiment einer Zelle an die Oberfläche, MHC II-Moleküle transportieren Peptide aus dem vesikulären Kompartiment. CD4 bindet das MHC II-Molekül, CD8 lagert sich an das MHC I-Molekül. Die Anlagerung einer CD8-positiven ( $CD8^+$ ) T-Zelle wirkt dabei zytotoxisch,  $CD4^+$  T-Zellen aktivieren andere Zellen und werden deshalb als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet.  $CD4^+$  Th-Zellen bilden verschiedene funktionelle Klassen, von denen die Th1- und Th2-Zellen am längsten bekannt sind (Mosmann et al. 1986). Th1-Zellen aktivieren Makrophagen und sind an der intrazellulären Abwehr beteiligt, während Th2-Zellen die B-Zellen aktivieren und damit die Antikörperproduktion induzieren. Th1-Zellen spielen darüber hinaus bei chronischen Entzündungen und Autoimmunreaktionen eine wichtige pathogenetische Rolle, während Th2-Zellen an allergischen Reaktionen beteiligt sind (Romagnani 1995, Annunziato & Romagnani 2009). In den letzten 10 Jahren sind weitere funktionelle Th-Subpopulationen beschrieben worden, von denen die regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) und die

Th17-Zellen sicherlich die wichtigsten sind (Abb. 3) (Sakaguchi et al. 1995, Harrington et al. 2005, Jäger & Kuchroo 2010). Nach neueren Erkenntnissen werden die IL-17-produzierenden Th17-Zellen für die Entwicklung von chronischen Entzündungen und den dabei auftretenden Gewebsschädigungen einschließlich dem Entstehen von organspezifischen Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht (Steinman 2007, Bettelli et al. 2008, Annunziato & Romagnani 2009), während die regulatorischen T-Zellen für die Erhaltung der peripheren Toleranz und das Verhindern von Autoimmunreaktionen zuständig sind (Sakaguchi 2004, Bettelli et al. 2006). In der Pathogenese des Sjögren-Syndroms spielen diese neuen Th-Subpopulationen anscheinend ebenfalls eine wichtige Rolle (Sharma et al. 2006, Christodoulou et al. 2008, Nguyen et al. 2008, Osnes et al. 2013).



**Abb. 3.** Differenzierung der verschiedenen Subpopulationen von Th-Zellen und deren wechselseitige Beeinflussung. Unter Beteiligung von APC und abhängig vom vorhandenen Zytokinmilieu differenzieren naive CD62L<sup>+</sup> Th-Zellen zu regulatorischen Th-Zellen (Treg) oder Effektorzellen vom Th1-, Th2- oder Th17-Typ. Jeder Th-Subtyp ist durch einen spezifischen Transkriptionsfaktor (Foxp3, RORγt, T-bet, GATA-3) und eine charakteristische Zytokinsekretion gekennzeichnet (modifiziert nach Irmeler & Bräuer 2007).



Die T-Zellen insgesamt sind maßgeblich für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich, die B-Zellen sind dagegen die Träger der humoralen Immunantwort (Bildung von Antikörpern). Wenn B-Zellen durch körperfremde Antigene aktiviert werden, können sie sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen (Memoryzellen) differenzieren. Die antikörpersezernierenden Plasmazellen erkennen extrazelluläre Antigene und verhindern durch deren Bindung und Zerstörung eine intrazelluläre Infektion bzw. Ausbreitung. Dafür ist die Aktivierung von B-Zellen durch T-Helferzellen erforderlich. Die freigesetzten Antikörper schützen den Organismus vor Infektionen über Neutralisierung der Antigene, Opsonisierung (Phagozytoseförderung) und Komplementaktivierung, das die Opsonisierung beschleunigt und z.B. Bakterien lysiert. Die Antigenspezifität des Rezeptors der B-Zellen wird durch die Verknüpfung bestimmter Gensegmente bestimmt. Die Segmente heißen V-, D- und J-Segmente, weshalb der Prozess als V-D-J-Rekombination bezeichnet wird. Dabei werden diese Segmente, die den antigenbindenden Teil des B-Zell-Rezeptors bilden, umgeordnet. Im Rahmen einer solchen Immunantwort entstehen aus den aktivierten B-Zellen die sogenannten Gedächtniszellen. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen werden diese schneller erkannt und präsentiert und so eine rasche Antikörperproduktion induziert (Immunisierung).

Der Begriff Cluster of Differentiation, abgekürzt CD, bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Bei den CD-Molekülen handelt es sich meistens um membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedenste Funktionen haben können. Einige CD-Moleküle haben Rezeptor- oder Signalfunktion, während bei anderen enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte; darüber hinaus wird einigen CD-Molekülen eine zentrale Rolle bei der interzellulären Kommunikation zugeschrieben. Der Nachweis der CD-Moleküle erfolgt üblicherweise mit monoklonalen Antikörpern, die diese Oberflächenstrukturen erkennen und binden.

Die in dieser Arbeit zur Charakterisierung des zellulären Infiltrates in labialen Speicheldrüsen von Patienten, zum Teil auch in submandibularen Speicheldrüsen von NOD-Mäusen verwendeten CD-Marker sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 4.** Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten CD-Marker

CD	Zelltyp
CD3	T-Zellen
CD4	T-Helferzellen
CD8	zytotoxische T-Zellen
CD20	B-Zellen
CD45	alle Leukozyten
CD45RO	Memory-T-Zellen
CD68	Makrophagen
CD79a	B-Zellen und Plasmazellen

### 2.9.2 Proliferation und Apoptose

Eine erhöhte Proliferation und gesteigerte Apoptoserate sind ein typisches Merkmal vieler Entzündungsreaktionen. Die Proliferationsrate kann im Gewebe mittels spezifischer Antikörper gegen das nukleäre Antigen Ki-67 bestimmt werden. Das Antigen ist während des Zellzyklus in unterschiedlicher Intensität nachweisbar, so z.B. während der G1- und S-Phase und in der G2/M-Phase, während es in ruhenden G0-Zellen nicht detektierbar ist. In umfangreichen Untersuchungen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Zahl Ki-67-positiver Zellen und der Proliferationsaktivität maligner Tumore gezeigt werden (Cattorett et al. 1992, Miller 1994). Ein viel verwendeter Antikörper, mit dem Ki-67 auch in Paraffin eingebettetem Material nachgewiesen werden kann, ist MIB-1, der auch in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Proliferationsaktivität in nativen oder fixierten Speicheldrüsenproben eingesetzt wurde.

Die Apoptose als Form des programmierten Zelltodes ist ein essentieller physiologischer Prozess, der wie die Proliferation für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus unabdingbar ist. Die Erstbeschreibung des gezielten Zelltodes erfolgte bereits 1842 von Carl Vogt beim Studium der Entwicklung von Kaulquappen. Der Begriff Apoptose wurde dann in den Untersuchungen von Kerr und seinen Mitarbeitern im Jahre 1972 erstmals eingeführt (Kerr et al. 1972).

Im Unterschied zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Fehlregulationen der Apoptose können erhebliche Störungen im Organismus hervorrufen. Degenerative, ischämische und autoimmune Erkrankungen, Missbildungen, Ausbreitung viraler Infektionen und Tumorentstehung sind mögliche Folgen (Saikumar et al. 1999). Die Apoptose unterscheidet von den anderen Formen des Zelltods, dass bei ihr eine Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen, sogenannte Caspasen, eine zentrale Rolle spielen. Während es bei der Nekrose zum Anschwellen der Zelle mit Zerstörung der Zellmembran und nachfolgender Phagozytose kommt, setzt bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle mit Abbau der DNA durch Endonukleasen ein (Zimmerman et al. 2001).

Zur Initiierung der Apoptose sind bisher zwei Wege bekannt. Der extrinsische Weg oder Apoptose Typ I wird durch Ligandenbindung an sogenannte Todes- (Death-) Rezeptoren (TNF-Rezeptor, Fas-Rezeptor) vermittelt (Ashkenazi et al. 1998). Der intrinsische oder mitochondriale Weg - Apoptose Typ II, erfolgt als intrazelluläre Reaktion auf diverse Stimuli, z.B. Medikamente, Toxine, Hypoxie, ionisierende Strahlung und virale Infektion (Strasser et al. 2000, Eguchi et al. 2001, Denault et al. 2002).

Die Anwesenheit von typischen DNA-Bruchstücken mit 3'-OH-Enden ist ein Merkmal von apoptotischen, nicht jedoch von nekrotischen Zellkernen. Die Spezifität der in-situ-Färbung von 3'-OH-Enden bei apoptotischen Zellkernen lässt apoptotische Zellen, die in dieser Art gefärbt sind, gut von Zellen mit nicht-apoptotischer DNA-Schädigung unterscheiden (Didenko & Hornsby 1996). Dementsprechend hat sich die TUNEL-Technik (**T**erminale deoxyribobosyltransferase-mediated **dUTP Nick End Labeling**) als Methode der Wahl zur Darstellung der Apoptose durchgesetzt. Dabei werden die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente mit Hilfe einer terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase mit Digoxigenin-Nukleotiden und Fluoreszein markiert. Da normale nicht-apoptotische Zellen nur sehr wenige freie 3'-OH-Enden enthalten, erlaubt diese in-situ-Technik eine Lokalisation des programmierten Zelltodes auf zellulärer Ebene.

### 2.9.3 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind endogene Proteinasen mit der Fähigkeit, extrazelluläre Matrix einschließlich der Basalmembran aufzuspalten. Sie gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und zum Um- und Abbau von Gewebe führen. Zu den Substraten der MMPs zählen verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (Birkedal-Hansen 1995, Cawston 1995, Ries & Petrides 1995, Basbaum & Werb 1996), wobei die einzelnen Metalloproteinasen eine sehr unterschiedliche Substratspezifität besitzen. Wachstum und Gewebsneubildung einschließlich Zellabbau bzw. Zellerneuerung sind wichtige physiologische Funktionen dieser Enzyme. Bei pathologischen Veränderungen spielen die katalytischen Aktivitäten der MMPs und deren Regulierung ebenfalls eine wesentliche Rolle. Solche Veränderungen wurden bei der Rheumatoiden Arthritis, bei Tumoren, chronischen Leberschädigungen und Wundheilungsprozessen nachgewiesen (Schumacher et al. 1994, Springer 1994, Burger et al. 1998) und inzwischen auch beim Sjögren-Syndrom (Yamachika et al. 1998, Perez et al. 2000, Goicovich et al. 2003). Infiltrierende Entzündungszellen, z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen können verschiedene MMPs synthetisieren (Müller-Ladner et al. 2000, van der Laan et al. 2000), ebenso residente Zellen, z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und Osteoklasten (Cornelius et al. 1995, Grant et al. 1996, Mitchell et al. 1996, Reboul et al. 1996).

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Substratspezifität, der Primärstruktur und ihrer zellulären Lokalisation werden die MMPs in mindestens fünf Hauptgruppen unterteilt (Murphy et al. 2002). Die Hauptgruppen bilden die Kollagenasen (z.B. MMP-1, MMP-13), die Stromelysine (z.B. MMP-3), die Gelatinasen (z.B. MMP-2, MMP-9), die Matrilysine und die membranständigen MMPs (z.B. MT1-MMP, MT2-MMP) (Matrisian 1992, Murphy et al. 2002).

In der Arbeit haben wir uns auf die MMP-9 und MMP-13 konzentriert, weil diese beiden Enzyme eine besonders wichtige Rolle beim Um- und Abbau von Bindegewebsstrukturen spielen, u.a. auch bei der Destruktion des Drüsengewebes beim Sjögren-Syndrom (Konttinen et al. 1998, 2006). Die Gelatinase MMP-9 hat als Substrat Gelatine, Proteoglykane, verschiedene Kollagentypen und Elastin. Die Gelatinasen haben die Fähigkeit, Kollagen Typ IV zu spalten, die Hauptstrukturkomponente von Basalmembranen. Außerdem zerstören sie denaturiertes Kollagen

(Gelatine) und unlösliches Elastin. Ihnen wird eine wichtige Rolle insbesondere bei der Kollagenzerstörung zugesprochen. Beim Sjögren-Syndrom ist die MMP-9 wahrscheinlich maßgeblich für die Destruktion der Basalmembran und des Stromas im Drüsengewebe verantwortlich (Konttinen et al. 1998, Perez et al. 2005).

MMP-13 ist ein Vertreter der Kollagenasen. Zu den Substraten werden verschiedene Kollagentypen, Aggrecan (Fosang et al. 1996), denaturierte Kollagene und weitere extrazelluläre Matrixkomponenten (Knäuper et al. 1996) gerechnet. Insbesondere beim Abbau von Kollagen Typ II besitzt MMP-13 eine hohe Effektivität. Bei chronischen Entzündungen der oralen Mucosa wird MMP-13 verstärkt exprimiert (Uitto et al. 1998), außerdem ist sie an der Fibrosierung beteiligt (Hiller et al. 2000). Die Expression von MMP-13 wird durch proinflammatorische Zytokine induziert (z.B. IL-1, IL-6), die auch beim Sjögren-Syndrom eine wichtige pathogenetische Rolle spielen (Suzuki et al. 2010). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der MMPs in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms und damit auch als Target für neuartige Therapieansätze (Azuma et al. 2000, 2002).

#### 2.9.4 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die von hämatopoetischen und verschiedenen anderen Zellen gebildet werden. Ihre Produktion kann durch ganz unterschiedliche Faktoren induziert werden, z.B. durch virale und bakterielle Produkte, Immunkomplexe, Komplementfaktoren und Akute-Phase-Proteine sowie durch andere Zytokine.

Die Zytokine spielen eine ganz zentrale Rolle bei der Regulation der angeborenen und der erworbenen Immunität, indem sie das Wachstum und die Differenzierung anderer Zellen kontrollieren. Dadurch sind sie auch maßgeblich an Entzündungs- und Autoimmunprozessen beteiligt. Sie kontrollieren die Richtung, Stärke und Dauer entzündlicher Reaktionen, so u.a. bei der Rheumatoiden Arthritis (Feldmann et al. 1996, Arendt 2001) und auch beim Sjögren-Syndrom (Roescher et al. 2009, 2010, Youinou & Pers 2011). Die verschiedenen Zytokine bilden ein komplexes Netzwerk synergistischer, inhibitorischer und antagonistischer Aktivitäten, wobei Störungen der normalerweise bestehenden Balance zu Immundefekten, Allergien und Autoimmunerkrankungen führen können. Ihre Einteilung in vorwiegend proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine widerspiegelt dabei deren Hauptfunktion bei entzündlichen Prozessen. Zytokine binden an spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen ihrer Zielzellen und lösen dadurch die Aktivierung bestimmter

Signaltransduktionswege aus, die schließlich zu den entsprechenden Reaktionen im Organismus führen (Firestein et al. 1999).

Beim Sjögren-Syndrom werden sowohl lokal in den Speicheldrüsen und im Speichel als auch systemisch im Blut verstärkt proinflammatorische Zytokine nachgewiesen, während antiinflammatorische Zytokine nicht oder nur schwach exprimiert werden (Roescher et al. 2009, 2010, Youinou & Pers 2011). Das Sjögren-Syndrom wird als eine Th1-geprägte Erkrankung angesehen, weil bei den proinflammatorischen Zytokinen primär IFN- $\gamma$  und deren verwandte Zytokine IL-12 und IL-18 sowie IL-2 dominieren, während das Th2-Zytokin IL-4 kaum nachweisbar ist (Brookes et al. 1996). Andererseits ist die bestehende Hypergammaglobulinämie und starke Autoantikörperproduktion sowie die Expression von IL-10, einem weiteren Th2-Zytokin, ein Beleg dafür, dass beim Sjögren-Syndrom auch das Th2-System aktiviert sein muss. Weitere Zytokine, die bei der T- und B-Zellaktivierung und Autoantikörperproduktion wichtig sind, wie IL-6 und der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF, sind ebenfalls hoch reguliert (Groom et al. 2002). Inzwischen gibt es auch gute Beweise dafür, dass das proinflammatorische Zytokin IL-17 in die Pathogenese des Sjögren-Syndroms involviert ist. So konnten IL-17 und das verwandte Zytokin IL-23 in Speicheldrüsen von Patienten mit Sjögren-Syndrom und in NOD-Mäusen nachgewiesen werden (Nguyen et al. 2008, Sakai et al. 2008, Katsifis et al. 2009). In experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass durch den Transfer von IL-17 in Speicheldrüsen von nicht-suszeptiblen C57BL/6-Mäusen Sjögren-Syndrom-ähnliche Symptome induziert werden können (Nguyen et al. 2010), während die gentherapeutische Blockade des IL-17-Rezeptors (IL-17R) in den Speicheldrüsen von NOD-Mäusen die pathologischen Veränderungen und funktionellen Defekte effektiv hemmt (Nguyen et al. 2011). Damit könnte diese Zytokingruppe wichtige Erfolg versprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Therapiestrategien des Sjögren-Syndroms enthalten.

## **2.10 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit Hilfe histologischer und immunhistochemischer Methoden das Entzündungsgeschehen in Lippen Schleimhautbiopsien von Patienten zu charakterisieren, die zur diagnostischen Abklärung eines Sjögren-Syndroms entnommen worden waren. Dazu sollten die Stärke der Entzündung und der begleitenden Fibrose sowie die Proliferations- und Apoptoseraten im Gewebe ermittelt werden. Als Maß für die in den Drüsen stattfindende Gewebsdestruktion sollten die Matrix-Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 bestimmt werden. Schließlich wurde das Entzündungsinfiltrat hinsichtlich seiner zellulären Zusammensetzung analysiert. Dabei wurde auch geprüft, ob bei den untersuchten Parametern Unterschiede zwischen primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom nachweisbar sind. Die Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte semiquantitativ und ohne Kenntnis der Zugehörigkeit der jeweiligen Probe zur entsprechenden Patientengruppe.

Da die Zahl der verfügbaren Patientenproben gering war, außerdem meistens nur leichte Entzündungen vorlagen und diese auch noch aus unterschiedlichen Phasen der Erkrankung stammten, haben wir vergleichbare Untersuchungen am Modell der NOD-Maus durchgeführt. Hier konnte der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Entzündung und Gewebsdestruktion sowie die Proliferations- und Apoptoseraten in den Speicheldrüsen unter exakt definierbaren Bedingungen untersucht werden. Außerdem wurde wiederum die Zusammensetzung des zellulären Infiltrats bestimmt und die aktuell besonders interessanten Zytokine IL-7 und IL-17 nachgewiesen, die eine wichtige pathogenetische Rolle im Krankheitsgeschehen spielen könnten. Aus den Untersuchungen erwarten wir neue Erkenntnisse über die Pathogenese des Sjögren-Syndroms, die zur Identifizierung neuer therapeutischer Targets und als Grundlage für die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien dienen könnten.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Lippenschleimhautbiopsien**

Die Lippenschleimhautbiopsie ist eine etablierte Maßnahme im Rahmen der Diagnostik und Differentialdiagnose des Sjögren-Syndroms (Tab. 2). Untersucht wurden Gewebeproben von 20 Patienten, die sich zur diagnostischen Abklärung eines Sjögren-Syndroms im Funktionsbereich Rheumatologie/Osteologie der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena (UKJ) vorgestellt hatten. Nach der Entnahme der Lippenschleimhautbiopsie durch die Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKJ erfolgte die Probenteilung. Ein Anteil wurde dem Institut für Pathologie zur sofortigen histologischen Routinediagnostik zugestellt. Die andere Probe wurde unmittelbar nach der Entnahme in OCT Tissue Tek Einbettungsmedium (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff (-196°C) tief gefroren. Bis zur Durchführung der hier vorgestellten erweiterten immunhistochemischen Diagnostik wurden die Proben bei -70°C aufbewahrt. Bei der histologischen Aufarbeitung wurden in 4 Proben keine Speicheldrüsen gefunden. Die Gesamtzahl der auswertbaren Präparate belief sich somit auf 16 Proben.

Während der Schnellschnittdiagnostik wurden von 6 Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKJ aus dem gesunden Randbereich von Operationspräparaten Kryoschnitte mit kleinen Speicheldrüsen angefertigt. Diese dienten als Kontrollgruppe zu den SS-Patienten.

##### **3.1.2 Patientendaten**

Ausgewertet wurden die Krankenakten der 16 Patienten mit klinisch gesicherter Sicca-Symptomatik, bei denen sich im Lippenschleimhautbiopsat kleine Speicheldrüsen nachweisen ließen. Die eingeschränkte Funktion der Tränen- bzw. Speicheldrüsen ist vor der Biopsieentnahme durch den Schirmer- oder Saxon-Test verifiziert worden. Nach Auswertung der Akten und der histologischen Befunde waren 11 Patienten an einem primären Sjögren-Syndrom erkrankt, bei den übrigen 5 Patienten wurde eine andere Kollagenose bzw. entzündliche Systemerkrankung als Auslöser der Beschwerden diagnostiziert, sie wurden deshalb dem sekundären Sjögren-Syndrom zugeordnet.



Daten über das Patientenkollektiv der Kontrollgruppe wurden nicht erhoben. An Hand der Patientenakten wurden außerdem Laborparameter, klinische Befunde und Symptome ausgewertet und teilweise in Symptomkomplexen zusammengeführt. Dabei wurden auch subjektive Angaben der Patienten zu Leistungsminderung, Müdigkeit und psychischer Beeinträchtigung aus der Anamneseerhebung mit erfasst.

### 3.1.3 Versuchstiere

Die NOD-Mäuse (NOD/Lt), die ursprünglich aus einer Zucht am Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire in Strasbourg, Frankreich (Profs. Dr. D. Mathis, Dr. C. Benoist) stammen, wurden unter SPF-Bedingungen in der Versuchstierhaltung an der Fachhochschule Bonn-Rhein-Sieg für die Generierung von K/BxN-Mäusen gehalten (Kouskoff et al. 1996). Männliche und weibliche Versuchstiere des entsprechenden Alters wurden uns dankenswerterweise von Prof. Dr. H. Illges für die Studie zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung für die Zucht und Haltung von Versuchstieren am Institut für Pathologie des UKJ durch das Thüringer Landesverwaltungsamt lag vor, die Regularien für den Umgang mit Versuchstieren wurden strikt eingehalten.

### 3.1.4 Verwendete Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank Kelvitron	Heraeus, Hanau
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Kryostat	Microm Laborgeräte, Walldorf
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss AG, Jena
Mikroskop Jenamed	Zeiss AG, Jena
Mikroskop-Kamera MC80 DX	Zeiss AG, Jena
Mikrowelle Typ 1002	GFL, Burgwedel
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Präzisionswaage BL150	Sartorius, Göttingen
Rotationsmikrotom RM 2045	Leica, Wetzlar
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Vortexgerät VV3	VWR International, Darmstadt

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Objektträger Superfrost Plus und Polylysine	Menzel, Braunschweig
Petrischalen 100/20 mm	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen, 14 ml	Greiner, Frickenhausen

### 3.1.6 Chemikalien

<i>Reagenz</i>	<i>Lieferant</i>
Aceton	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAB (Diaminobenzidine)	Merck, Darmstadt
Diethylether	Fischer, Saarbrücken
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Baker, Deventer, Holland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Ferak, Berlin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	Roth, Karlsruhe
Haematoxylin	Merck, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	Baker, Deventer, Holland
Iso-Propanol	Serva, Heidelberg
KCl (Kaliumchlorid)	Baker, Deventer, Holland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)	Fluka, Buchs, Schweiz
Levamisol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lichtgrünlösung (Goldnerlösung III)	Hollborn, Leipzig
Magermilchpulver	Heirler Canovis, Radolfzell
Masson-Goldner-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Baker, Deventer, Holland

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)	Sprengstoffwerke, Schönebeck
Naphtol-AS-Bi-Phospat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Natriumzitat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
OCT Tissue Tek Einbettungsmedium	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Propandiol (2 Amino-2 Methylpropan-1,3-diol)	Fluka, Buchs, Schweiz
StatStrip Xpress Glucose Monitor	Nova Biomedical, Waltham, MA, USA
Tris(hydroxy)-aminomethan	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 3.1.7 Puffer und Lösungen

#### PBS (phosphate-buffered saline), 0.01 M. pH 7.2

8 g NaCl  
0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0.2 g KCl  
ad 1 l Aqua bidest.

#### Immunhistochemie-Substratlösungen

##### ***Alkalische Phosphatase:***

87.5 ml Entwicklungspuffer (1.21 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 5.85 g NaCl,  
ad 1 l Aqua bidest.)  
31.5 ml Propandiol  
50 mg Levamisol  
25 mg Natriumnitrit  
62.5 mg Naphtol-As-Bi-Phosphat  
250 mg Neufuchsin (5 g in 100 ml 2N HCl gelöst)  
1 ml 1N HCl

***Peroxidase:***

3 mg DAB in 5 ml Tris-HCl-Puffer lösen,  
50 µl 3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben und filtrieren

**4%ige Trismilch**

4 g Magermilchpulver  
ad 100 ml Tris-HCl-Puffer

**Zitratpuffer, pH 3.8**

25.5 g Zitronensäure  
22 g Natriumzitat  
ad 100 ml Aqua bidest.

**3.1.8 Antikörper****Primäre Anti-Human-Antikörper**

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an Patientenproben wurden folgende Antikörper verwendet (Tab. 5):

**Tabelle 5.** Übersicht über die verwendeten Anti-Human-Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>gegen</b>	<b>Isotyp/Klon Markierung</b>	<b>Konzen.</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD4</b>	T-Helferzellen	Maus-IgG1/13.B8.2 unmarkiert	1:200	Immunotech/ Dianova
<b>CD8</b>	zytotoxische TZ	Maus-IgG1/B9.11 unmarkiert	1:200	Immunotech/ Dianova
<b>CD20</b>	B-Zellen	Maus-IgG1/B-ly1 unmarkiert	1:100	Immunotech/ Dianova
<b>CD45</b>	Leukozyten	Maus-IgG1/2B11 unmarkiert	1:100	Dako
<b>CD45RO</b>	Memory-TZ	Maus-IgG2a/UCHL1 unmarkiert	1:200	Dako
<b>CD68</b>	Makrophagen	Maus-IgG2b/PG-M1 unmarkiert	1:50	Dako
<b>CD79a</b>	B-/Plasmazellen	Maus-IgG1/JCB117 unmarkiert	1:100	Dako
<b>MMP-9</b>	MMP-9	Maus-IgG1/GE-213 unmarkiert	1:100	Chemicon
<b>MMP-13</b>	MMP-13	Maus-IgG1/VIIIA2 unmarkiert	1:100	Chemicon
<b>Ki-67</b>	Ki-67 Antigen (Proliferation)	Maus-IgG1/MIB-1 unmarkiert	1:30	Dianova
<b>TUNEL-Kit</b>	DNA- Fragmentation (Apoptose)	In Situ Cell Death Detec- tion Kit Alkalische Phosphatase	50 µl	Roche

### Primäre Anti-Maus-Antikörper

Für die Untersuchungen an NOD-Mäusen wurden folgende Antikörper verwendet (Tab. 6):

**Tabelle 6.** Übersicht über die verwendeten Anti-Maus-Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>gegen Maus</b>	<b>Klon/Isotyp Markierung</b>	<b>Konzen.</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD3</b>	T-Zellen	Ratten-IgG2a/C363.29B Biotin	1:100	Dianova
<b>CD4</b>	T-Helferzellen	Ratten-IgG2b/GK1.5 Biotin	1:100	Laborpräparat
<b>CD8</b>	zytotoxische TZ	Ratten-IgG2b/2.4.3 Biotin	1:100	Laborpräparat
<b>B220</b>	B-Zellen	Ratten-IgG/B220 Biotin	1:50	Pharmingen
<b>Mac-1</b>	Makrophagen	Ratten-IgG2b/M1/70 Biotin	1:50	Laborpräparat
<b>IL-7</b>	IL-7	polyklon. Ziegen-IgG/M-19 unmarkiert	1:50	Santa Cruz
<b>IL-17</b>	IL-17	polyklon. Kaninchen-IgG/ H-132, unmarkiert	1:50	Santa Cruz
<b>Ki-67</b>	Ki-67 Antigen (Proliferation)	Ratten-IgG/TEC 3 unmarkiert	1:30	Dako
<b>TUNEL-Kit</b>	DNA- Fragmentation (Apoptose)	In Situ Cell Death Detec- tion Kit Alkalische Phosphatase	50 µl	Roche

Für den Nachweis von Ki-67 und der Zytokine IL-7 und IL-17 in Paraffinschnitten wurden die histologischen Präparate zur Erhöhung der Antigenität vor der immunhistochemischen Markierung für 5 min. in der Mikrowelle vorbehandelt.

### Isotypenkontrolle/Negativkontrolle

Unspezifische Reaktionen, bedingt durch den Isotyp des Antikörpers, wurden durch den Gebrauch polyklonaler Antikörper des gleichen Isotyps wie bei der spezifischen Reaktion ausgeschlossen.

Zur Anwendung kamen polyklonale Anti-Maus- und Anti-Ratten-IgG1-, IgG2a- und IgG2b-Antikörper aus Kaninchen (Dianova, Hamburg).

Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurden außerdem Negativkontrollen mitgeführt, indem der Primärantikörper weggelassen wurde, alle übrigen Schritte aber nach Protokoll erfolgten.

### Sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (Brückenantikörper) (Dako, Hamburg)

Biotin-konjugierte Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziege (Dianova)

Biotin-konjugierte Anti-Ratten-IgG-Antikörper aus Ziege (Dianova)

Biotin-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (Dianova)

Biotin-konjugierte Anti-Ziegen-IgG-Antikörper aus Kaninchen (Dianova).

### Detektionssysteme / Tertiärantikörper

Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin (Dianova, Hamburg)

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Dianova, Hamburg)

APAAP-Komplex (monoklonal aus Maus) (Dako, Hamburg)

## **3.2 Methoden**

### 3.2.1 Probenpräparation

Submandibuläre Speicheldrüsen von NOD-Mäusen unterschiedlichen Alters (6, 12, 24 oder 36 Wochen alte Tiere) wurden chirurgisch präpariert, für 24 Std. in 4.5%igem gepufferten Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden Schnitte von 5 µm Stärke angefertigt und für die Färbungen auf Objektträger aufgezogen. In einigen Fällen, wenn kein paraffingängiger Antikörper vorlag, wurden die Drüsen unmittelbar nach der Entnahme in OCT Tissue Tek Einbettungsmedium (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Nachfolgend wurden die Proben bis zur Anfertigung von Kryoschnitten bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2.2 Glucosebestimmung

Vor der Präparation der Speicheldrüsen wurden die Tiere zur Gewinnung des Serums mit Ether narkotisiert, durch Durchtrennen der Arteria carotis communis entblutet und anschließend durch cervikale Dislokation abgetötet. Das koagulierte Blut wurde anschließend bei 5.000 U/min abzentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Auswertung bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Glucosegehaltes im Serum erfolgte mittels StatStrip Xpress (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA) im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des UKJ.

### 3.2.3 Histologische Färbungen

Für die Bewertung der Entzündung und der Gewebsschädigung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin entsprechend dem Standardverfahren gefärbt, für die Bewertung des Ausmaßes der Fibrosierung wurde die Goldner-Färbung eingesetzt (Romeis 1989).

### 3.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

#### Alkalische Phosphatase-Technik

1. Fixieren der Gefrierschnitte in Aceton: 5 min
- 1b. Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in A. bidest. überführt
2. 3x spülen mit Tris-Puffer (0,05 M; pH 7,6)
3. Proteinblockierung 5% Ziegenserum in 4%iger Tris-Milch: 30 min
4. Primärantikörper in 2%iger Tris-Milch : 45 min
5. Spülen mit Tris-Puffer
6. Biotinylierter Sekundärantikörper in 2%iger Tris-Milch mit 10% Humanserum 1:500: 30 min
7. Spülen mit Tris-Puffer
8. Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin in 2%iger Tris-Milch 1:400: 30 min
9. Spülen mit Tris-Puffer/Leitungswasser
10. Substratlösung ansetzen (siehe Puffer und Lösungen) und Schnitte damit bedecken, Farbentwicklung unter mikroskopischer Kontrolle
11. Unterbrechen der Farbentwicklung durch Zugabe von Leitungswasser
12. Kernfärbung (Haematoxylin nach Meyer)
13. Schnitte eindecken

#### Peroxidase-Technik

1. Fixieren der Gefrierschnitte in Aceton: 5 min
- 1b. Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in A. bidest. überführt

2. 3x spülen mit Tris-Puffer
3. Proteinblockierung 5% Ziegen Serum in 4%iger Tris-Milch: 30 min
4. Primärantikörper in 2%iger Tris-Milch : 45 min
5. Spülen mit Tris-Puffer
6. Biotinylierter Sekundärantikörper in 2%iger Tris-Milch mit 10% Humanserum 1:500: 30 min, RT
7. Spülen mit Tris-Puffer
8. Fixieren in 1%igem Formalin: 3 min
9. 3x waschen mit Tris-Puffer
10. Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität: 0.3%  $H_2O_2$  in 0.1M  $NaN_3$  auf Schnitte auftragen: 20 min
11. 3x waschen mit Tris-Puffer
14. Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in 2%iger Tris-Milch 1:400: 30 min
12. 3x waschen mit Tris-Puffer
13. Peroxidasesubstrat auftragen (siehe Puffer und Lösungen): 5-15 min
14. Kerne färben und Schnitte eindecken

#### APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Technik)-Methode

1. Fixieren der Gefrierschnitte in Aceton: 5 min
- 1b. Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in A. bidest. überführt
2. 3x spülen mit Tris-Puffer
3. Proteinblockierung 5% Ziegen Serum in 4%iger Tris-Milch: 30 min
4. Primärantikörper in 2%iger Tris-Milch: über Nacht, 7°C
5. Spülen mit Tris-Puffer
6. Brücken-AK (Kaninchen-anti-Maus) auftragen (Verdünnung in 2%iger Tris-Milch 1:70): 45 min
7. Spülen mit Tris-Puffer
8. APAAP-Komplex 1:70 in 2%iger Tris-Milch: 45 min
9. Waschen mit Tris-Puffer
10. Schritte 7-10 1- bis 2-mal wiederholen
11. Entwicklungslösung ansetzen (siehe Chemikalien und Alkalische Phosphatase-Technik) und Schnitte damit bedecken, Farbentwicklung unter Mikroskop verfolgen



## 12. Unterbrechung der Farbentwicklung mit Leitungswasser

### Kernfärbung und Eindecken der Schnitte

#### 3.2.5 Bewertung der histologischen Befunde

Die histologischen und immunhistochemischen Präparate wurden unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen und ohne Kenntnis der Versuchsgruppe bewertet („verblindet“). Grundlage der Bewertung war die Stärke der entsprechenden Reaktion im Gewebe, die mittels eines semiquantitativen Scores eingeschätzt wurde. Die genaue Vorgehensweise wird in den entsprechenden Ergebnisteilen detailliert beschrieben.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der experimentellen Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel und der IBM Statistic Software SPSS (Version 17) durchgeführt. Da keine Normalverteilungen vorlagen, wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels des Mann-Whitney u-Test berechnet. Die Tests wurden jeweils zweiseitig durchgeführt, als signifikant wurden Werte von  $p < 0.05$  angesehen. Die Darstellung der Ergebnisse in den Abbildungen erfolgt für die humanen Proben in Form von Boxplots mit 25., 50. und 75. Percentile (Quartile), bei den NOD-Mäusen werden die Ergebnisse als Säulendiagramme mit Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen der Lippenbiopsien von Patienten mit Sjögren-Syndrom

#### 4.1.1 Patienten

Von den 20 Proben der untersuchten Patientengruppe waren in 4 Biopsien keine kleinen Speicheldrüsen nachweisbar, so dass mit den entsprechenden Patientenakten noch 16 Fälle zur Auswertung kamen. Dabei handelt es sich um 12 Frauen und 4 Männer, zum Zeitpunkt der Untersuchungen mit einem durchschnittlichen Alter von 50,9 Jahren. Die jüngste Patientin war 27 Jahre alt, die älteste Patientin 67 Jahre.

Bei allen Patienten bestand eine gesicherte Sicca-Symptomatik der Augen und der Mundhöhle, die mittels Schirmer- oder Saxon-Test nachgewiesen worden war. 5 Patienten litten nach Studium der Akten an einer weiteren Autoimmunerkrankung, 2 Frauen hatten ein Sharp-Syndrom bzw. eine Rheumatoide Arthritis, bei den 3 männlichen Patienten wurden eine unklare Vaskulitis, eine Granulomatose mit Polyangiitis (Wegener) oder eine undifferenzierte Kollagenose als Grunderkrankung diagnostiziert. Diese Patienten wurden dem sekundären Sjögren-Syndrom zugeordnet (sSS, n=5). In den Unterlagen der übrigen 11 Patienten fanden sich keine Hinweise auf andere Grunderkrankungen bzw. Kollagenosen und sie wurden deshalb als primäres Sjögren-Syndrom eingeordnet (pSS, n=11).

#### 4.1.2 Paraklinik

Alle Patienten hatten erhöhte antinukleäre Antikörper (ANA) im Blutserum. Bei über 60% der pSS-Patienten und 80% der sSS-Patienten waren Anti-SS-A/SS-B-Antikörper und erhöhte Entzündungsmarker (Leukozyten und CRP über dem Referenzbereich) nachweisbar (Tab. 7). Konkrete Angaben zu den Rheumafaktoren lagen nur von wenigen Patienten vor.

**Tabelle 7.** Paraklinik

	gesamt	pSS	sSS
	%	%	%
Antinukleäre Antikörper (ANA)	100	100	100
Anti-SS-A/SS-B-Antikörper	69	64	80
Entzündungsparameter	75	64	100

#### 4.1.3 Klinik

In beiden Patientengruppen lagen die Hauptsymptome der Augen- und Mundtrockenheit vor, die als sSS eingestuft Patienten litten deutlich häufiger unter zusätzlichen Beschwerden. Diese sowie weitere subjektive Angaben der Patienten sind in Tab. 8 dargestellt und müssen nicht ursächlich mit dem Sjögren-Syndrom in Zusammenhang stehen.

**Tabelle 8. Klinik**

<b>Symptome/ andere Erkrankungen</b>	<b>gesamt</b>	<b>pSS</b>	<b>sSS</b>
	%	%	%
Xerostomie	100	100	100
Xerophtalmie	100	100	100
Raynaud-Syndrom	88	82	100
Arthralgien	69	55	100
Hautsymptome	63	55	80
Leistungsinsuffizienz	56	36	100
Gastrointestinale Störungen	44	36	60
Kardiovaskuläre Störungen	44	36	60
Nierenfunktionseinschränkungen	44	36	60
Lymphknotenschwellung	31	27	40
Sexuelle Störungen	31	18	60
Parotisschwellung	31	27	40
Lungenerkrankungen	25	27	20
Psychische Störungen	19	18	20

Starke Angstzustände, Panikattacken und Depressionen wurden den psychischen Störungen zugeordnet. Eingeschränkte Lungenfunktion in der Spirometrie, diagnostizierte Lungenfibrose und angegebene rezidivierende Hustenanfälle weisen auf eine Lungenbeteiligung hin. Wenige Angaben fanden sich zu Libidoverlust, Potenzstörung oder Dyspareunie als sexuelle Störungen. Häufiger klagten die Patienten über subjektive Leistungsminderung. Anamnestisch gehäuft wurden Hautsymptome genannt, wie Hautausschläge, trockene Haut, Hautreizung sowie Juckreiz. Zu den gastrointestinalen Störungen wurden Dysphagie, Obstipation, Diarrhö und Bauchschmerzen bzw. Druckgefühl nach der Nahrungsaufnahme gezählt. Herzrhythmusstörungen, Zustand nach Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder eingeschränkte Pumpfunktion in der Echokardiografie und arteriosklerotische

Veränderungen wurden unter kardiovaskulären Störungen zusammengefasst. Erhöhte Nierenretentionsparameter ließen eine entsprechend gestörte Funktion annehmen. Die Lymphknotenschwellungen fanden sich cervical, axillär und inguinal bei den Aufnahmeuntersuchungen.

#### 4.1.4 Bewertung der Entzündung

Die Auswertung des lymphozytären Infiltrates zur Beurteilung der kleinen Speicheldrüsen in den Lippenbiopsaten erfolgte semiquantitativ in Anlehnung an das Graduierungsschema von Chrisholm und Mason (1968) (Tab. 9). Dabei wird die Lymphozyteninfiltration pro Gesichtsfeld bei einer Vergrößerung von 1:100 im Drüsengewebe beurteilt und die morphologische Besonderheit des lymphozytären Focus berücksichtigt. Als Focus wird eine Aggregation von 50 oder mehr Lymphozyten pro Gesichtsfeld bezeichnet.

**Tabelle 9.** Grading für Lippenbiopsien (modifiziert nach Chrisholm und Mason, 1968)

Grad	Lymphozyten pro Gesichtsfeld
0	Fehlend
1	Geringe Infiltrate
2	Moderate Infiltrate < 1 Focus
3	1 Focus
4	> 1 Focus

Von den 16 untersuchten Proben zeigten jeweils nur ein Patient der Gruppe mit primärem Sjögren-Syndrom und ein Patient der Gruppe mit sekundärem Sjögren-Syndrom eine fokale Ansammlung des lymphozytären Infiltrates (Grad 3). Mehr als ein Focus (Grad 4) ließ sich in keiner Probe nachweisen. 6 Biopate der pSS-Gruppe zeigten eine geringe Entzündung (Grad1), die 4 verbleibenden Proben eine mäßige Entzündungsreaktion (Grad 2). Bei dem Material der sSS-Patienten zeigten 2 geringe Entzündungszeichen und 2 mäßige Veränderungen. In der Kontrollgruppe war in 2 Proben ein geringes Infiltrat vorhanden, Foci wurden nicht gefunden.

Vergleicht man die Entzündungsreaktion in den labialen Speicheldrüsen der Patienten, zeigten sich zwischen primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom keine signifikanten Unterschiede, im Vergleich mit der Kontrollgruppe waren jedoch die Reaktionen signifikant erhöht (Abb. 4A; Abb. 5A,B).

Zur Abschätzung der Fibrosierung wurde die Graduierung der Proben ebenfalls in 4 Stufen vorgenommen: keine, leichte, mäßige und starke Fibrose. Insgesamt wiesen alle SS-Patienten nur leichte bis mäßige Veränderungen auf (Grad 1-2), ohne dass Unterschiede zwischen der pSS- und sSS-Gruppe vorhanden waren. In der Kontrollgruppe zeigte sich nur bei einem Patienten ein geringgradig (Grad 1) verstärkter Gewebeumbau (Abb. 4B; Abb. 5C,D), insgesamt war der Unterschied zu den SS-Patienten hoch signifikant ( $p < 0.001$ ).

Zur semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für MIB, TUNEL, MMP-9 und MMP-13 wurde die 4-stufige Unterteilung beibehalten. Zur Untersuchung der erwarteten Veränderungen von Proliferation und Apoptose wurden ein MIB-1-Antikörper und der TUNEL-Kit eingesetzt. Zwischen pSS- und sSS-Patienten zeigten sich keine Unterschiede, gegenüber den Kontrollen waren hier aber deutlich erhöhte Proliferationsprozesse und auch eine Erhöhung der Apoptoserate zu sehen (Abb. 4C,D; Abb. 5E,F).

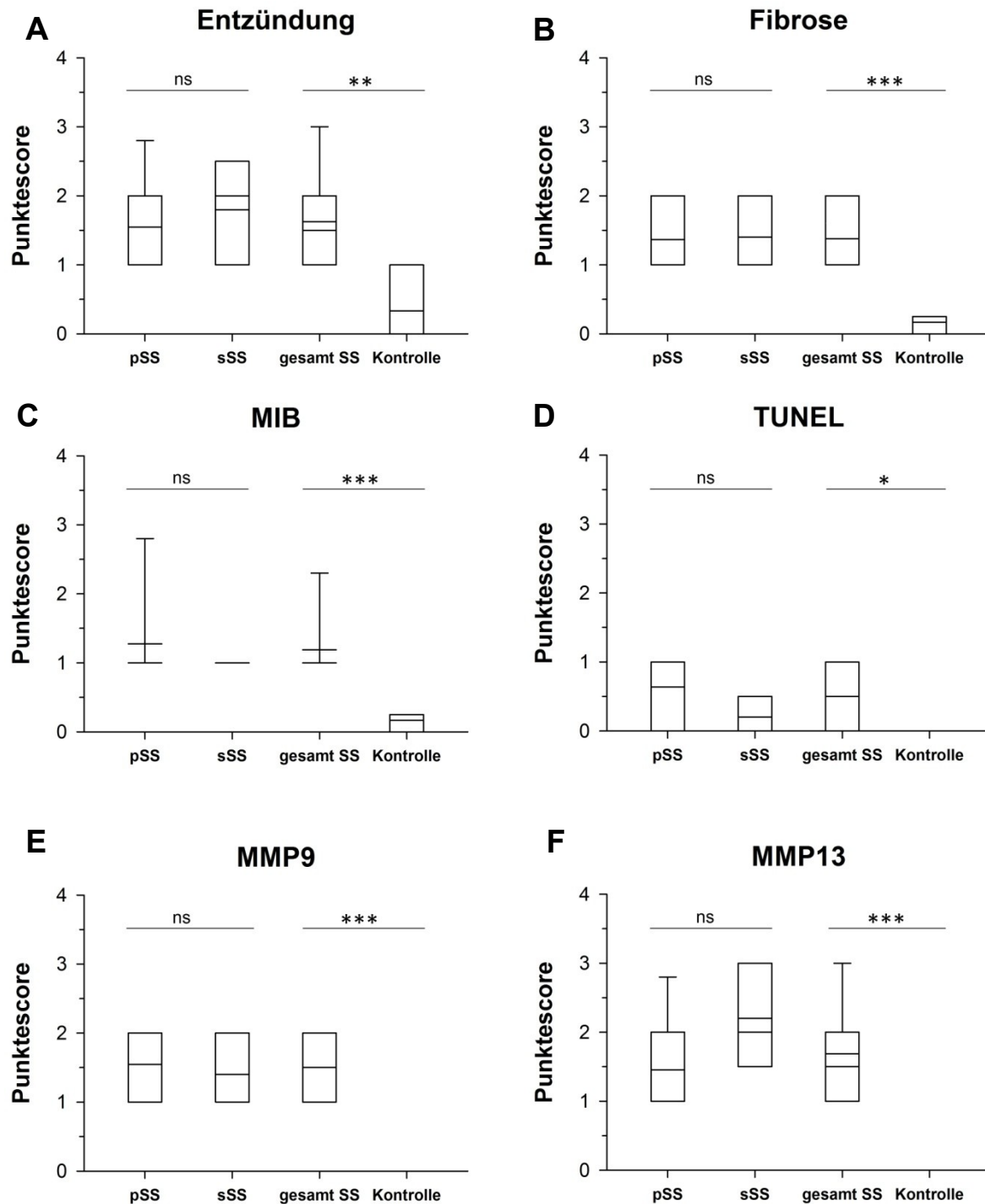
Die untersuchten Matrix-Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 ließen sich in den Kontrollen nicht nachweisen, wurden aber in beiden Patientengruppen in geringem Maße und ohne unterschiedliche Ausprägung gefunden (Abb. 4E,F).

#### 4.1.5 Zelluläres Infiltrat

Die semiquantitative Bewertung der immunhistochemischen Färbungen des zellulären Infiltrates erfolgte mittels eines 8-stufigen Scores, wobei 0 kein spezifischer Nachweis bedeutet, während bei Grad 7 über 50% der Zellen gefärbt sind (Tab. 10).

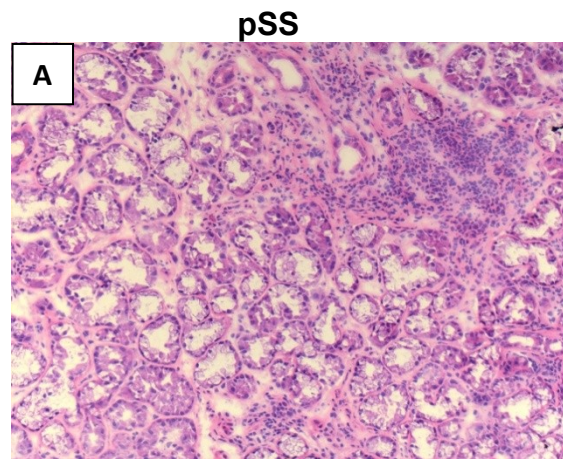
**Tabelle 10.** Antikörperscore

<b>Grad</b>	<b>Positive Färbung des zellulären Infiltrats in %</b>
0	0
1	<1
2	1
3	<10
4	10
5	<50
6	50
7	>50

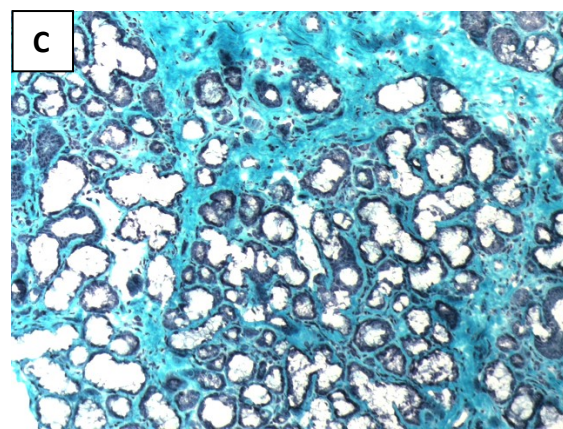


**Abb. 4.** Histologische und immunhistochemische Darstellung der Entzündungsparameter in labialen Speicheldrüsen von Patienten mit primärem (pSS) und sekundärem Sjögren-Syndrom (sSS) sowie Kontrollprobanden. A: Entzündung (H&E), B: Fibrose (Goldner), C: Proliferation (Ki-67/MIB-1), D: Apoptose (TUNEL), E: MMP-9, F: MMP-13). ns: nicht signifikant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

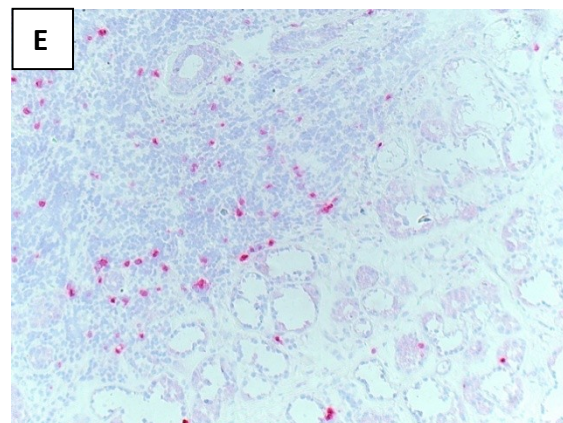




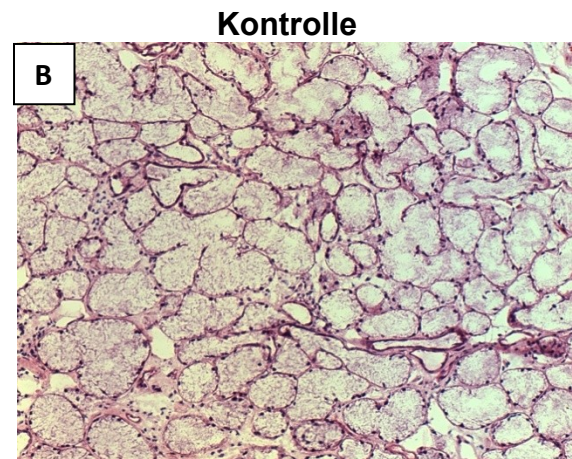
**H&E**



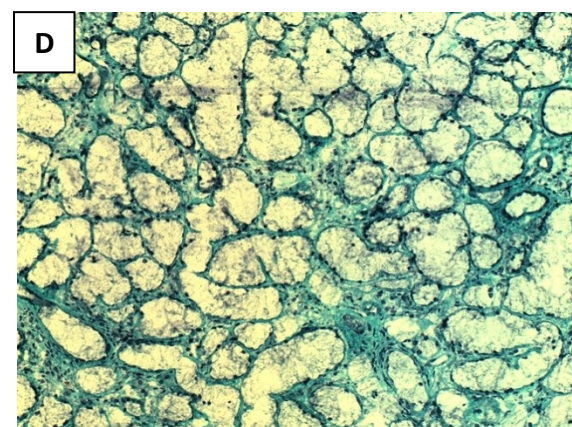
**Goldner**



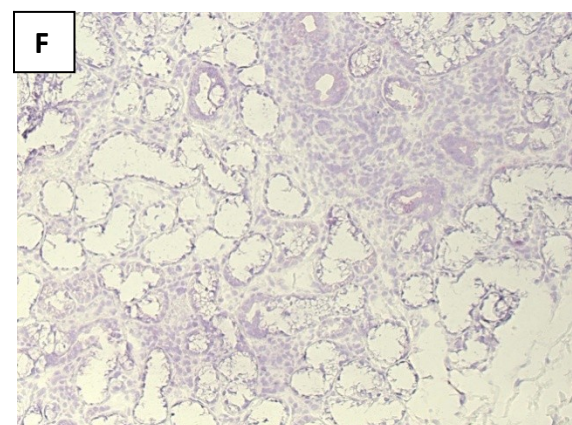
**MIB**



**H&E**



**Goldner**



**MIB**

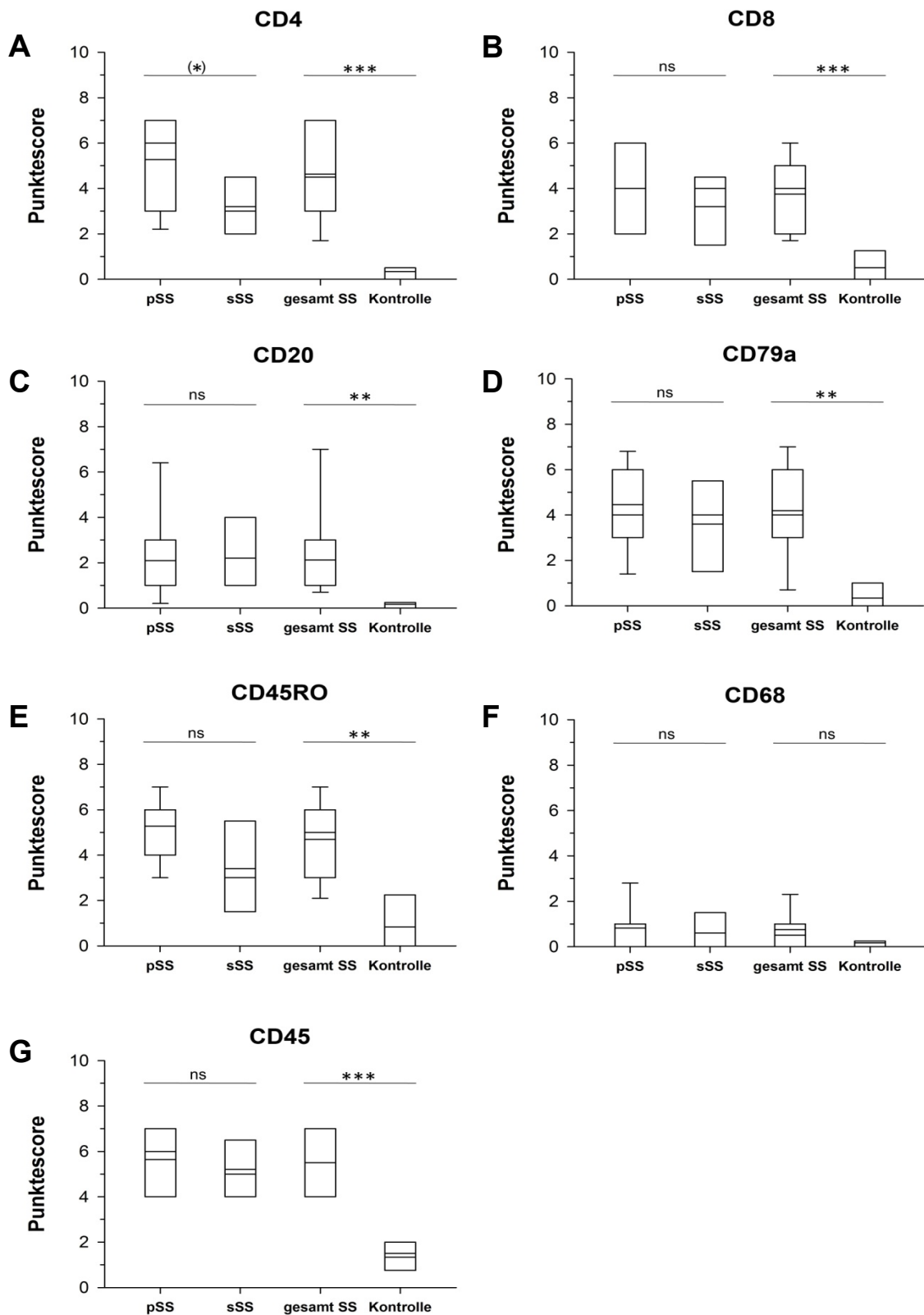
**Abb. 5.** Repräsentative Beispiele der histologischen und immunhistochemischen Darstellung der Entzündungsreaktionen in labialen Speicheldrüse von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom (pSS) und von Kontrollprobanden. A,B: Entzündung (H&E), C,D: Fibrose (Goldner), E,F: Proliferation (Ki-67/MIB-1). Vergrößerungen: x100.

Im zellulären Infiltrat dominieren die  $CD4^+$  T-Helferzellen. Beim primären Sjögren-Syndrom sind es mit mehr als 50% die am häufigsten vorkommenden Zellen. Beim sekundären SS ist die Zahl der T-Helferzellen anscheinend etwas geringer, ohne dass dieser Unterschied allerdings Signifikanz erreichte. Die  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen sind in beiden Patientengruppen mit ca. 10% nahezu gleich stark im Drüsengewebe vorhanden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind beide Marker hochsignifikant stärker nachweisbar (Abb. 6A,B).

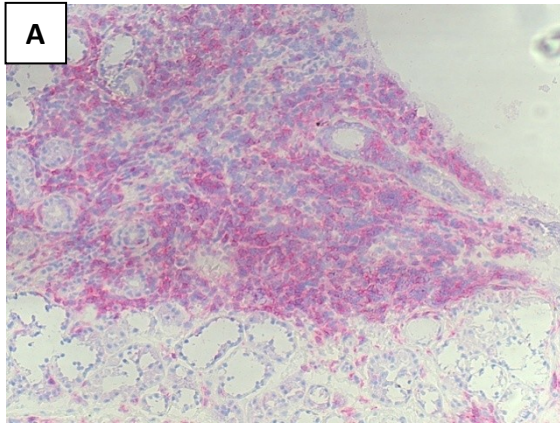
Unterschiede bei den B-Zellen ( $CD20^+$  Zellen) und bei B-Zellen plus Plasmazellen ( $CD79a^+$  Zellen) zeigten sich zwischen pSS und sSS nicht, obgleich diese Populationen im Infiltrat insgesamt in geringerer Zahl vorhanden sind (ca. 10%) als die detektierbaren T-Zellen (Abb. 6C,D). Bei den  $CD20^+$  Zellen fallen allerdings die großen individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten auf, was an den großen Standardabweichungen erkennbar ist. In Abb. 7C ist ein Beispiel mit einer sehr starken  $CD20$ -Expression dargestellt. Diese Zellpopulationen, wie auch die  $CD45RO^+$  Zellen (Memory-T-Zellen) und die Gesamt-Leukozyten ( $CD45^+$  Zellen) wurden in beiden Patientengruppen ähnlich stark nachgewiesen. Die Markierungen waren in der Kontrollgruppe nur in geringem Umfang zu detektieren, so dass in der gesamten SS-Gruppe eine signifikant stärkere Ausprägung der oben genannten Marker gegenüber der Kontrollgruppe bestand (Abb. 6E,G, Abb. 7D,F).

$CD68^+$  Makrophagen finden sich in geringer Zahl in allen untersuchten Proben (Abb. 6F, Abb. 7E). Obwohl  $CD68$  in den Patientengruppen etwas stärker exprimiert wird, sind sowohl zwischen den Patienten mit primärem oder sekundärem Sjögren-Syndrom als auch im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

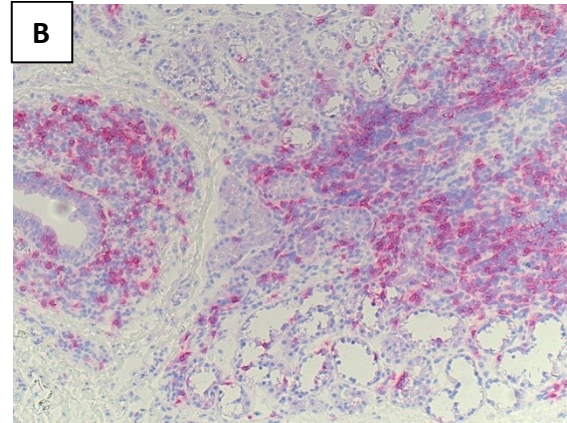




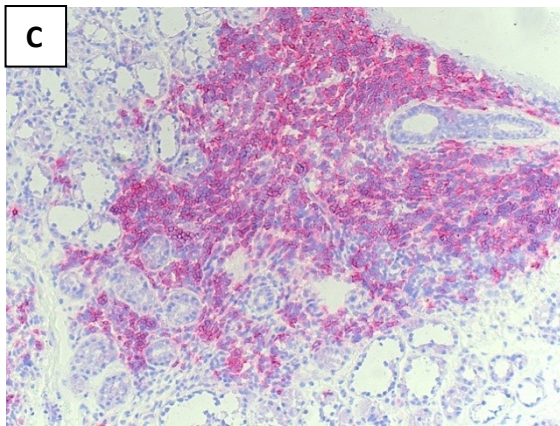
**Abb. 6.** Immunhistochemische Charakterisierung des zellulären Infiltrates in labialen Speicheldrüsen von Patienten mit primärem (pSS) und sekundärem Sjögren-Syndrom (sSS) sowie Kontrollprobanden. A: T-Helferzellen (CD4), B: zytotoxische T-Zellen (CD8), C: B-Zellen (CD20), D: B-/Plasmazellen (CD79a), E: Memory-T-Zellen (CD45RO), F: Makrophagen (CD68), G: Leukozyten (CD45). ns: nicht signifikant, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



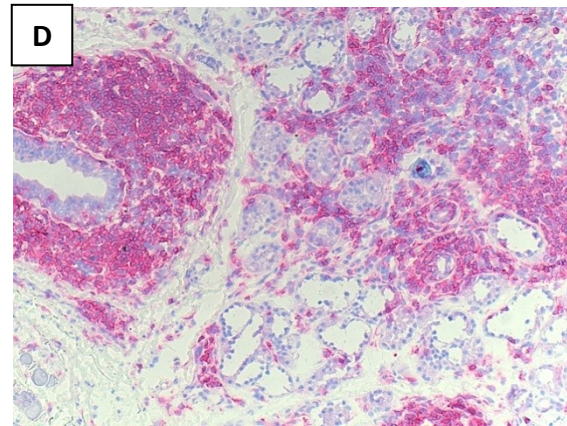
CD4



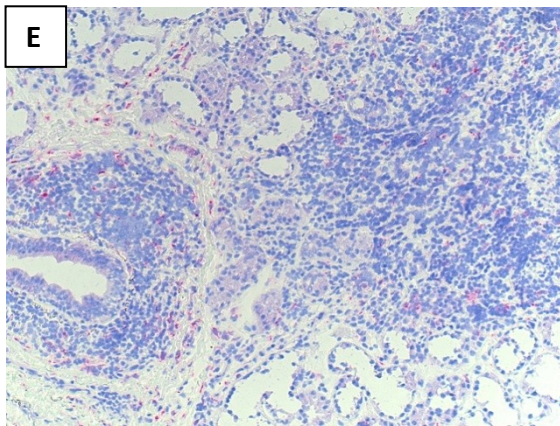
CD8



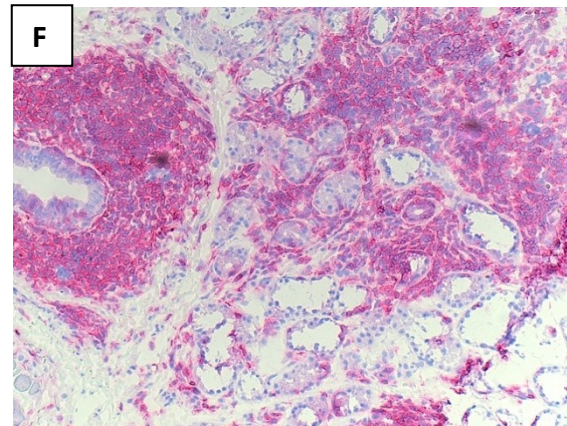
CD20



CD45RO



CD68



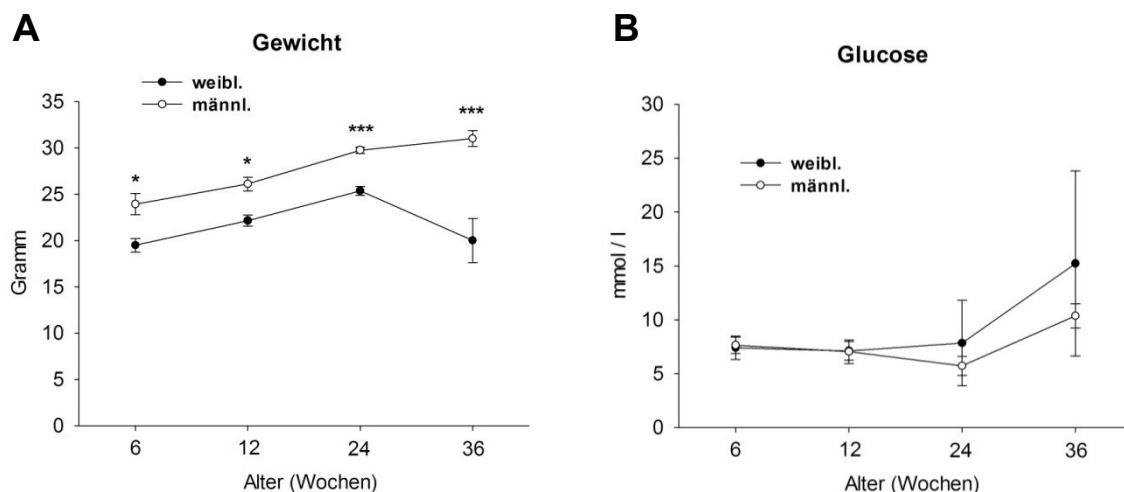
CD45

**Abb. 7.** Beispiel einer starken immunhistochemischen Markierung des zellulären Infiltrates in labialen Speicheldrüsen einer Patientin mit primärem Sjögren-Syndrom. A: T-Helferzellen (CD4), B: zytotoxische Zellen (CD8), C: B-Zellen (CD20), D: Memory-T-Zellen (CD45RO), E: Makrophagen (CD68), F: Leukozyten (CD45). Alkalische Phosphatase x100.

## 4.2 Untersuchungen am Modell der NOD-Maus

Untersucht wurden histologische Präparate von submandibularen Speicheldrüsen von insgesamt 70 männlichen und weiblichen NOD-Mäusen aus 4 verschiedenen Altersgruppen, von 6, 12, 24 und 36 Wochen alten Tieren. Pro Altersgruppe und Geschlecht wurden mindestens 6 Tiere analysiert.

Wie der Name NOD, non-obese diabetic (nicht-adipös diabetisch), bereits ausdrückt, entwickeln diese Mäuse im Verlauf ihres Lebens einen autoimmunen Typ 1 Diabetes (T1D). Bei weiblichen Tieren beginnt die Infiltration des Pankreas bei einem Alter von 12-14 Wochen, bei männlichen Tieren etwas später (Anderson & Bluestone 2005, Driver et al. 2011). Die Gewichtsentwicklung und die Bestimmungen des Glucosegehalts im Blut reflektieren die Diabetesentwicklung in unseren Mäusen (Abb. 8). Während die männlichen Tiere kontinuierlich an Gewicht zunehmen, fällt das Körpergewicht der weiblichen Tiere nach der 24. Woche wieder ab, sicherlich als Ausdruck des beginnenden Diabetes. Der Blutzucker steigt in beiden Geschlechtern nach der 24. Woche an, bei weiblichen Tieren dabei etwas stärker, ohne dass aufgrund der großen Streuungen der Unterschied zwischen den Geschlechtern Signifikanz erreichte (Abb. 8, Tab. 11). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Inzidenz des Diabetes bei weiblichen NOD-Mäusen mit 60-80% höher ist als bei männlichen Tieren mit 20-30% (Anderson & Bluestone 2005).



**Abb. 8.** Entwicklung des Körpergewichts und des Glucosegehalts im Blut bei männlichen und weiblichen NOD-Mäusen im Verlauf der Untersuchung.  $n > 6$  pro Gruppe, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  beim Vergleich der Geschlechter. Die Signifikanzen für den zeitlichen Verlauf sind in Tabelle 11 aufgeführt.

#### 4.2.1 Entzündung der submandibularen Speicheldrüsen

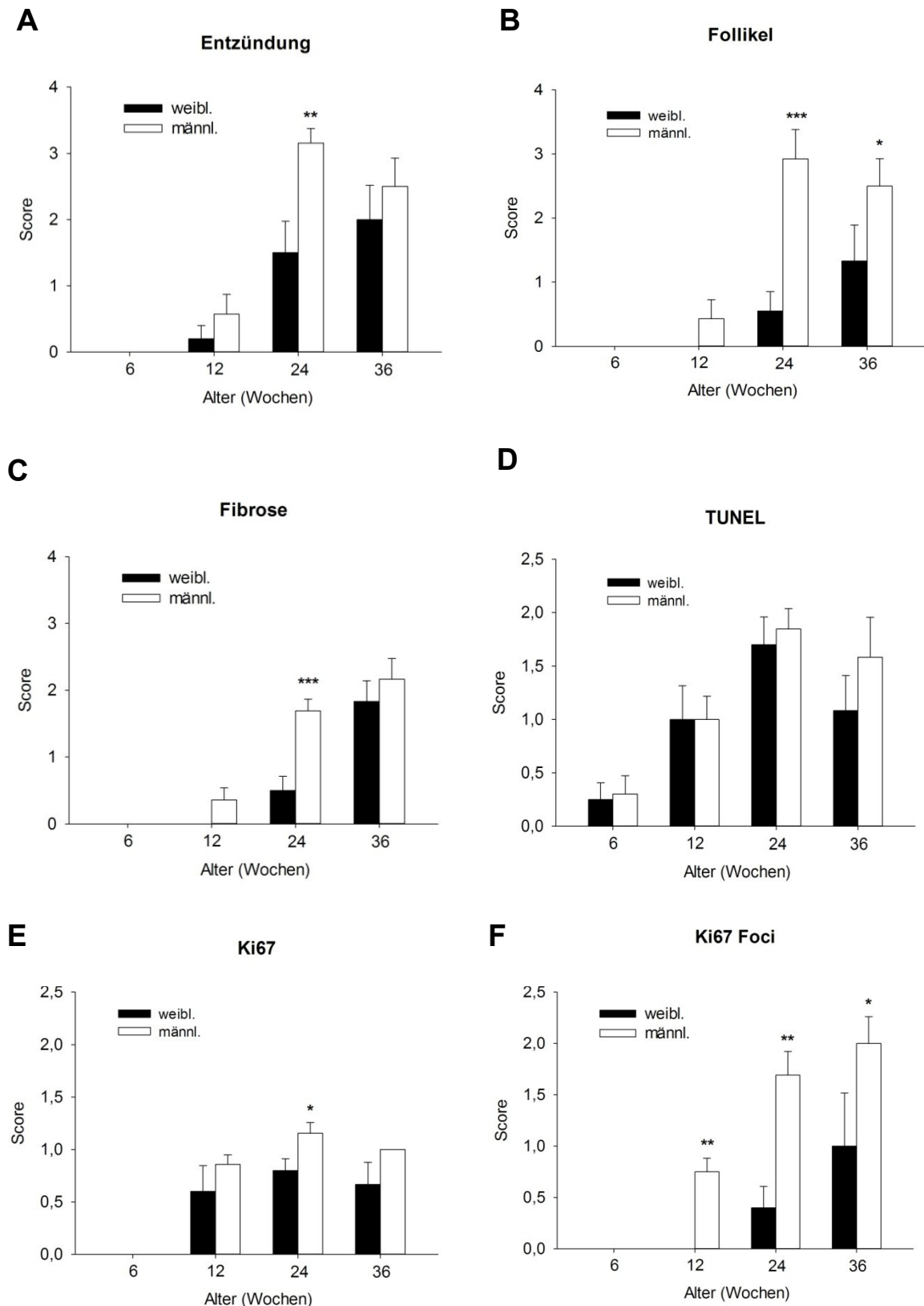
Die Entwicklung der SS-ähnlichen Erkrankung verlief dagegen in unseren NOD-Mäusen etwas anders. Die Entzündung der submandibularen Speicheldrüsen mit Infiltration von inflammatorischen Zellen und Bildung von Lymphfollikeln war in beiden Geschlechtern nach 12 Wochen nachweisbar und stieg bis zum Alter von 24 Wochen stark an, wobei die männlichen Tiere signifikant stärker betroffen waren als die weiblichen (Abb. 9A,B; Abb. 10 H&E). Im weiteren Verlauf gab es keine deutliche Zunahme mehr und der Geschlechtsunterschied verringerte sich, allerdings war die Follikelbildung bei männlichen Tieren im gesamten Versuchszeitraum deutlich stärker ausgeprägt als bei weiblichen Tieren. Wegen der Übersichtlichkeit der grafischen Darstellungen sind die Signifikanzen (p-Werte) zwischen den 4 verschiedenen Zeitstufen in Tabelle 11 zusammengefasst.

Parallel zur Entzündung nahm auch die Fibrosierung und Destruktion des Drüsengewebes zwischen 12 und 24 Wochen zu, mit signifikant stärkerer Reaktion bei den männlichen Tieren, doch die weiblichen Tiere holten bis zur 36. Woche diesen Rückstand wieder auf (Abb. 9C, Abb. 10 Goldner).

Im Gegensatz zum Diabetes, wo die Inzidenz bei weiblichen Tieren deutlich höher ist als bei männlichen Tieren (Anderson & Bluestone 2005), waren SS-ähnliche histologische Veränderungen wie inflammatorische Infiltration mit Follikelbildung und Destruktion des Drüsengewebes in allen untersuchten Tieren nachweisbar, d.h. die Inzidenz des Sjögren-Syndroms betrug 100%, nur die Stärke der Reaktionen war unterschiedlich.

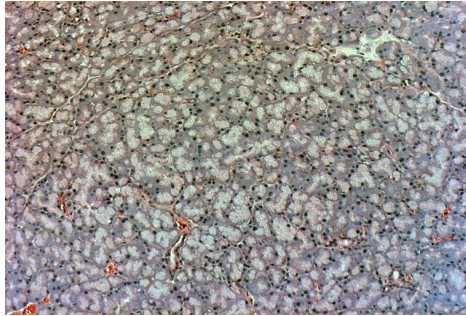
Die Raten der Apoptose (TUNEL) und der Proliferation (Ki-67) im Drüsengewebe stiegen ebenfalls bis zur 24. Lebenswoche stark an, hier aber ohne die auffälligen Geschlechtsunterschiede (Abb. 9D,E; Abb. 11 TUNEL, Ki-67). In den männlichen Tieren waren die Raten zwar immer etwas höher und erreichten bei der Proliferation im Gesamtgewebe bei 24 Wochen die Signifikanzgrenze. In den Lymphfollikeln allerdings waren die Proliferationsraten bei männlichen Tieren über den gesamten Versuchszeitraum signifikant höher als bei weiblichen Tieren (Abb. 9F), wobei die Follikelbildung selbst in den männlichen Tieren schon stärker war (Abb. 9B).



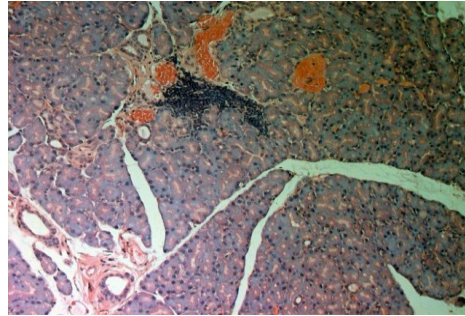


**Abb. 9.** Histologische und immunhistochemische Darstellung der Entzündungsreaktionen in submandibularen Speicheldrüsen von männlichen und weiblichen NOD-Mäusen im zeitlichen Verlauf (A-C). D: Apoptose (TUNEL), E, F: Proliferation (Ki-67). n>6 pro Gruppe, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 beim Vergleich der Geschlechter; Signifikanzen zwischen den Zeitstufen: siehe Tabelle 11.

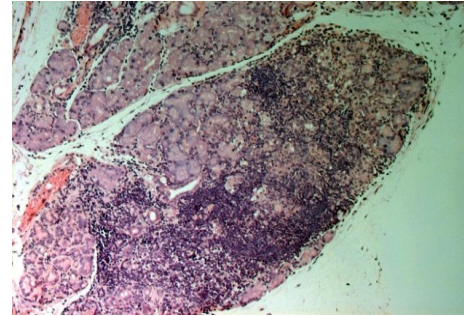
6 Wochen



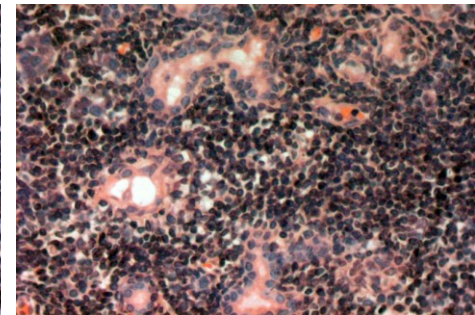
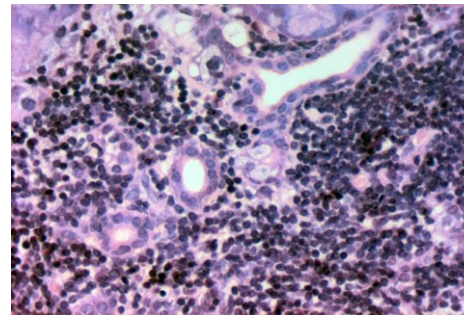
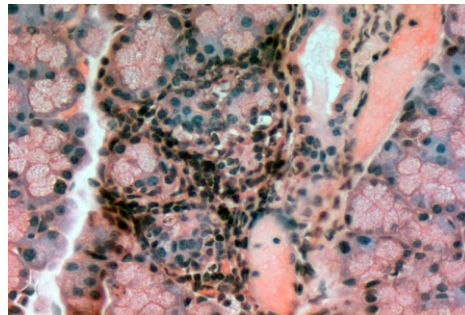
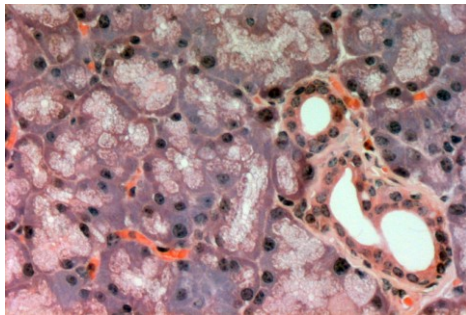
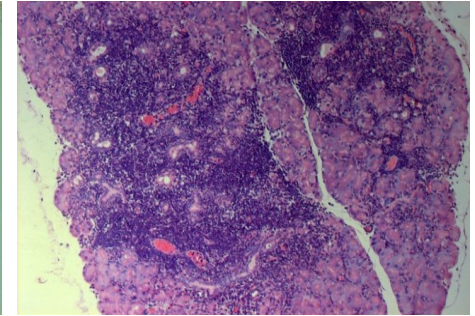
12 Wochen



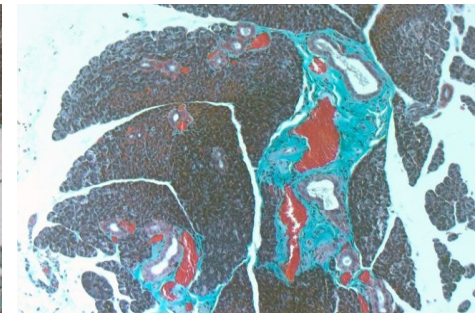
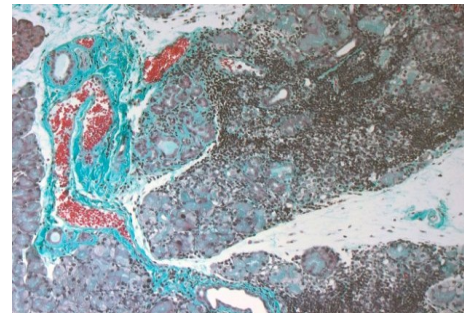
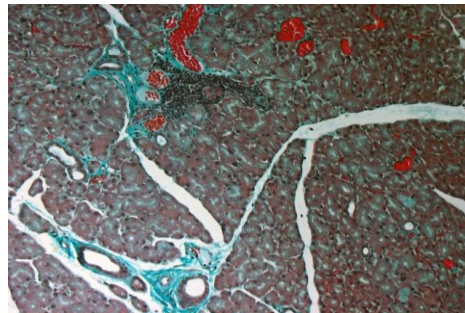
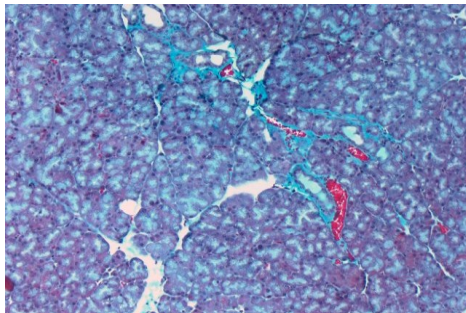
24 Wochen



36 Wochen



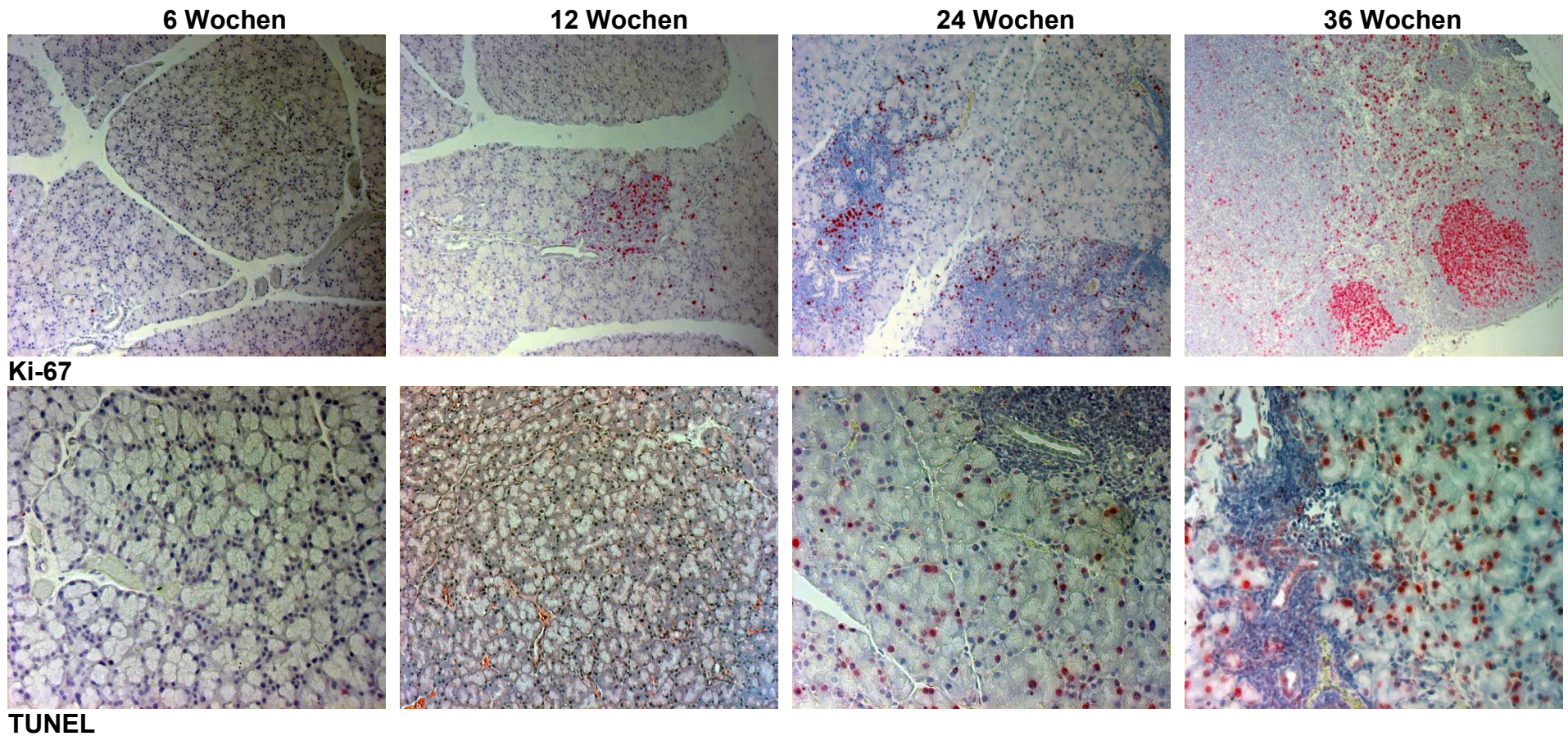
H&E



Goldner

**Abb. 10.** Repräsentative Beispiele für den zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion und Gewebsdestruktion (H&E) sowie der Fibrosierung (Goldner) in submandibularen Speicheldrüsen von NOD-Mäusen. H&E x100 (1. Reihe), x400 (2. Reihe), Goldner x100.





**Abb. 11.** Repräsentative Beispiele für den zeitlichen Verlauf der Proliferation (Ki-67) und der Apoptose (TUNEL) in submandibularen Speicheldrüsen von NOD-Mäusen. Alkalische Phosphatase x100 (1. Reihe), x200 (2. Reihe).

**Tabelle 11.** Ergänzende Signifikanzwerte in den Abb. 8, 9 und 12 ( $p < 0.0xx$ )

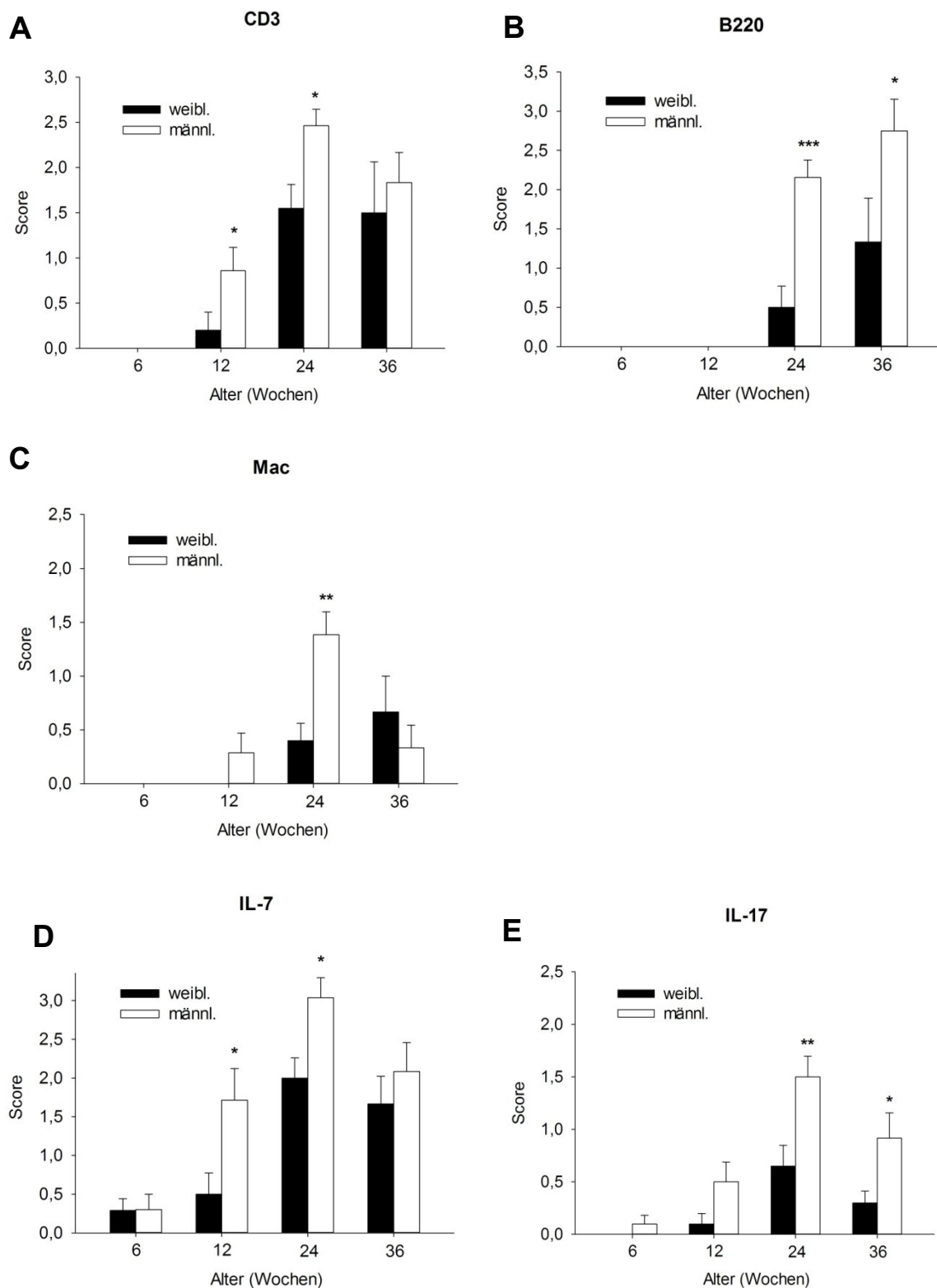
	Weibliche Tiere						Männliche Tiere					
Wochen	6/12	6/24	6/36	12/24	12/36	24/36	6/12	6/24	6/36	12/24	12/36	24/36
<b>Abb.8</b>												
Gewicht	-	0.01	-	0.01	-	0.05	-	0.001	0.01	0.001	0.01	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05
<b>Abb. 9</b>												
Entzündung	-	0.05	0.01	-	0.01	-	-	0.001	0.01	0.001	0.01	-
Follikel	-	-	0.05	-	0.05	-	-	0.001	0.01	0.01	0.01	-
Fibrose	-	0.05	0.01	-	0.01	0.01	-	0.001	0.001	0.05	-	-
TUNEL	-	0.01	-	-	-	-	0.05	0.001	0.05	0.05	-	-
Ki-67	0.05	0.01	0.05	-	-	-	0.01	0.001	0.001	0.05	-	-
Ki-67 Foci	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-
<b>Abb. 12</b>												
CD3	-	0.001	0.05	0.01	-	-	0.05	0.001	0.01	0.001	0.05	-
B220	-	-	0.05	-	0.05	-	-	0.001	0.01	0.001	0.01	-
Mac	-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	0.01	-	0.01
IL-7	-	0.01	0.01	0.01	0.05	-	0.05	0.001	0.05	0.05	-	-
IL-17	-	-	-	-	-	-	-	0.001	0.01	0.01	-	-



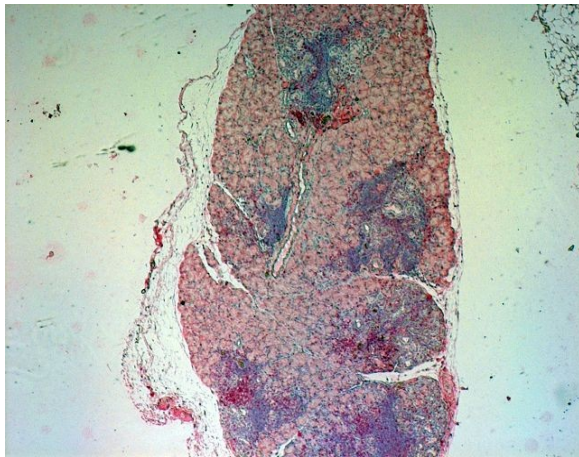
#### 4.2.2 Zelluläres Infiltrat und Zytokine

Die immunhistochemischen Analysen der Entwicklung und Zusammensetzung des zellulären Infiltrates in den Speicheldrüsen haben gezeigt, dass die Entzündung mit der Infiltration von T-Zellen (CD3) beginnt (Abb. 12A, Abb. 13 CD3). Bei 6 Wochen alten Tieren ist noch kein entzündliches Infiltrat vorhanden, aber nach 12 Wochen sind erste T-Zellen nachweisbar, die bis zur 24. Woche weiter ansteigen, wobei die männlichen Tiere wiederum signifikant stärker betroffen sind als die Weibchen. Bei den T-Zellen handelt es sich vorwiegend um CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, wie spezifische Färbungen an Kryoschnitten gezeigt haben (Abb. 13 CD4), während CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen nur in sehr geringer Zahl vorkommen. Die T-Zellen infiltrieren dabei das gesamte Drüsengewebe, sind aber besonders in den Lymphfollikeln angereichert. Im späteren Verlauf der Erkrankung, d.h. nach 24 Wochen, sind auch B-Zellen (B220) nachweisbar, nahezu ausschließlich in Lymphfollikeln, und bei männlichen Tieren wiederum signifikant mehr als bei Weibchen (Abb. 12B, Abb. 13 B220). Makrophagen (Mac) sind nur in geringer Zahl im Infiltrat vorhanden, bei männlichen Tieren sind sie ab der 12. Woche nachweisbar, mit einem Anstieg bis zur 24. Woche, dem Zeitpunkt, wo sie auch in weiblichen Tieren vorkommen, allerdings signifikant weniger (Abb. 12C). Nach 36 Wochen ist die Zahl der Makrophagen wieder gering und ohne deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

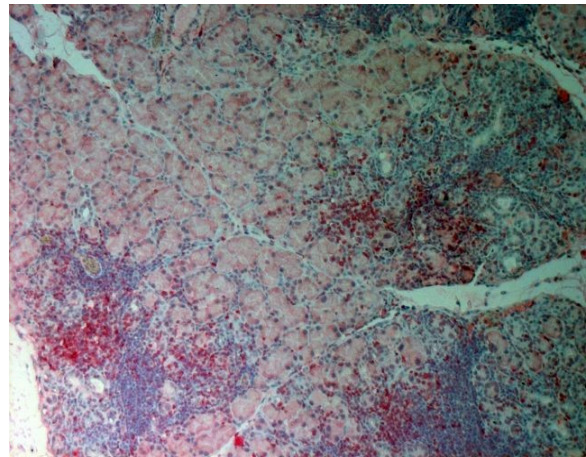
Aufgrund der aktuellen Bedeutung der Zytokine IL-7 und IL-17 bei der Induktion und Progression von Entzündungsreaktionen bei Autoimmunerkrankungen und in Modellen (Korn et al. 2009, Lundström et al. 2012, Dooms 2013) haben wir versucht, die Expression dieser Zytokine in den submandibularen Speicheldrüsen unserer NOD-Mäuse immunhistochemisch nachzuweisen. IL-7 ist bereits in 6 Wochen alten Tieren, also noch bevor eine zelluläre Infiltration stattfindet, in geringen Mengen im Drüsenstroma nachweisbar und steigt danach bis zur 24. Woche an, besonders stark in männlichen Tieren (Abb. 12D, Abb. 14). Bis zur 36. Woche verbleiben die IL-7-Level im Drüsengewebe relativ hoch, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Das proinflammatorische Zytokin IL-17 ist im Verlauf der Erkrankung in geringen Mengen ebenfalls sehr zeitig im Drüsenstroma und in Epithelzellen der Drüsengänge nachweisbar (Abb. 12E, Abb. 14). Bei 24 und 36 Wochen alten Tieren wird IL-17 dann auch in Lymphfollikeln gefunden, bei männlichen Tieren wiederum signifikant stärker als bei Weibchen (Abb. 12E, Abb. 14).



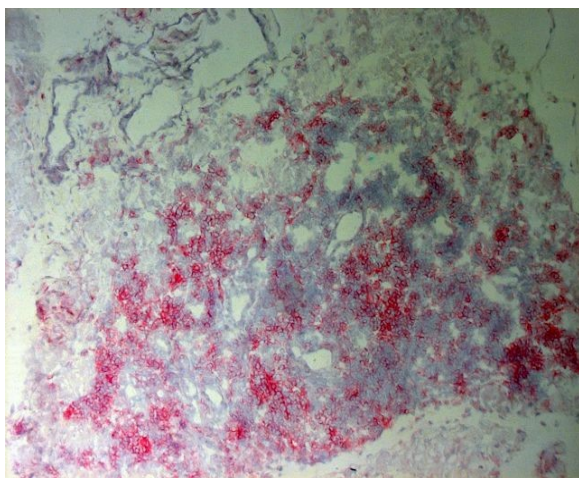
**Abb. 12.** Immunhistochemische Charakterisierung des zellulären Infiltrates und Expression der Zytokine IL-7 und IL-17 in submandibularen Speicheldrüsen von männlichen und weiblichen NOD-Mäusen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung. A: T-Zellen (CD3), B: B-Zellen (B220), C: Makrophagen (Mac). N>6 pro Gruppe; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 beim Vergleich der Geschlechter; Signifikanzen zwischen den Zeitstufen: siehe Tabelle 11.



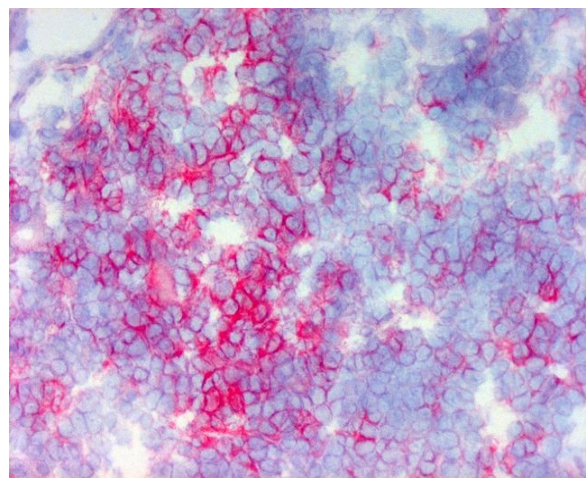
**CD3 x40**



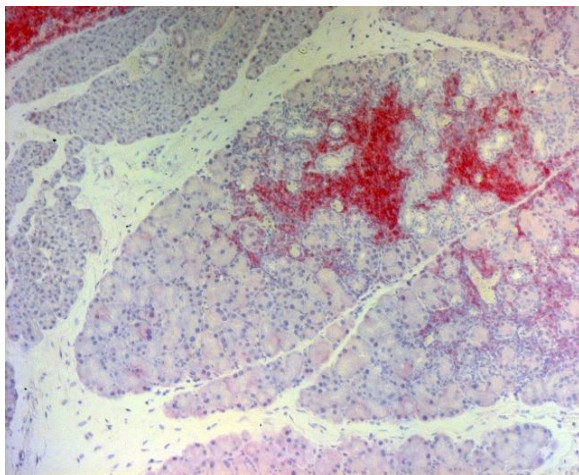
**x100**



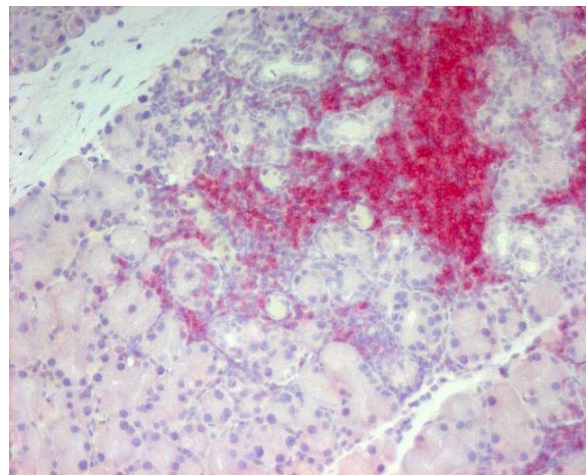
**CD4 x100**



**x400**



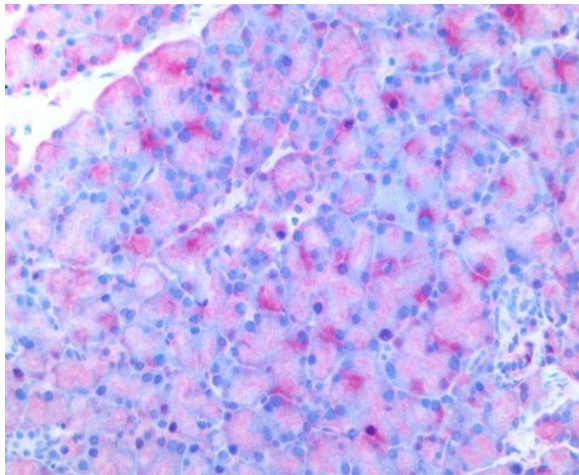
**B220 x100**



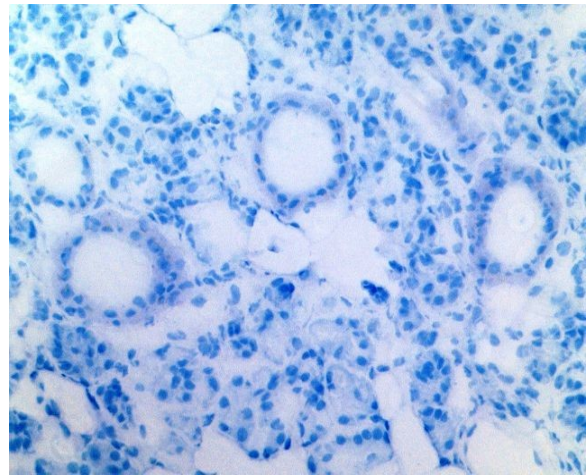
**x200**

**Abb.13.** Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Markierung des zellulären Infiltrates in submandibularen Speicheldrüsen von 24 Wochen alten männlichen NOD-Mäusen. T-Zellen (CD3), T-Helferzellen (CD4), B-Zellen (B220). Alkalische Phosphatase, Vergrößerungen: x40, x100, x200, x400.

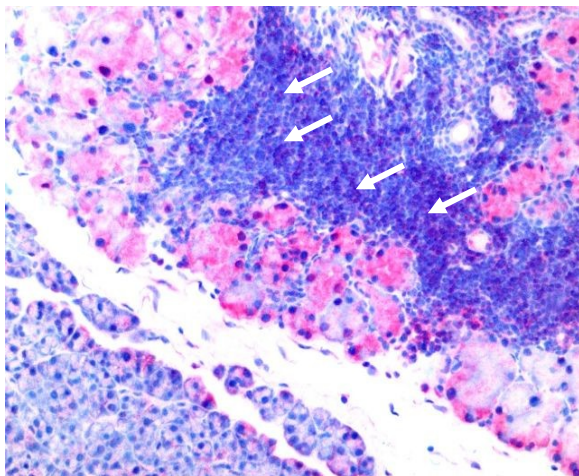




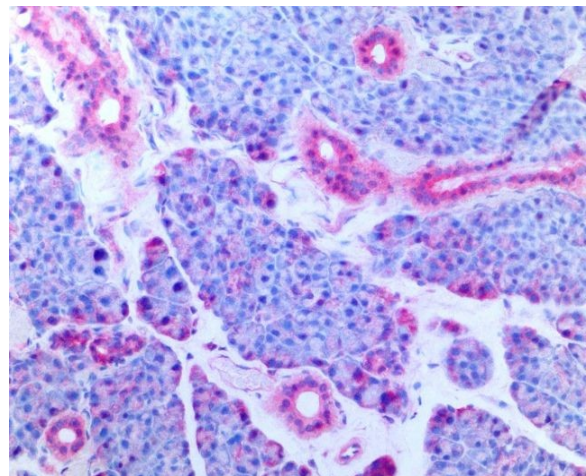
**IL-7 x200**



**Isotypkontrolle x200**



**IL-17 x200**



**IL-17 x200**

**Abb. 14.** Repräsentative Beispiele des immunhistochemischen Nachweises von IL-7 und IL-17 in submandibularen Speicheldrüsen von 24 Wochen alten männlichen NOD-Mäusen. IL-7 ist vorwiegend im Drüsenstroma nachweisbar, IL-17 im Drüsenstroma, in Lymphfollikeln (Pfeile) und in epithelialen Zellen der Ausführungsgänge. Alkalische Phosphatase, Vergrößerungen: x200.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Patientendaten**

#### **5.1.1 Klinik und Paraklinik**

Das Sjögren-Syndrom ist eine Autoimmunerkrankung mit zahlreichen, zum Teil auch unspezifischen klinischen Zeichen und Organmanifestationen. Leitsymptome sind die Augen- und Mundtrockenheit, die allerdings auch im Rahmen anderer Erkrankungen auftreten können. Bei den 16 Patienten, von denen Lippenschleimhautbiopsien untersucht wurden, war die Sicca-Symptomatik führend. Bei der Auswertung der Krankenakten zeigten sich neben der gesicherten Insuffizienz von Speichel- und Tränendrüsen ein sehr inhomogenes Bild, sowohl in der Schwere der Sicca-Symptomatik als auch in den Begleitsymptomen und der subjektiven Wahrnehmung durch die Patienten. Die häufigen extraglandulären Manifestationen des Sjögren-Syndroms erschweren die Diagnose und Klassifizierung der Erkrankung. Das zeigte sich auch im untersuchten Kollektiv.

Alle Patienten hatten in ihrer Anamnese eine längere ambulante Behandlung durch Nicht-Rheumatologen. So fanden ärztliche Erstkontakte häufig im stomatologischen und ophthalmologischen Bereich statt. Die milden unspezifischen extraglandulären Beschwerden können am Beginn der Erkrankung sehr leicht fehlinterpretiert werden. Alle Patienten litten an Xerostomie und Xerophthalmie. Auch wenn die Gruppengröße und Verteilung der Patienten keine sichere statistische Analyse erlaubte, zeigten die Patienten mit sekundärem Sjögren-Syndrom tendenziell vermehrt extraglanduläre Störungen als die Vertreter der primären Erkrankung. Bedingt ist dies durch die zusätzliche bzw. ursächliche Erkrankung als Auslöser des sekundären Sjögren-Syndroms (Fox 2005, Hansen & Dörner 2010, Mavragani & Moutsopoulos 2014).

In der gesamten Gruppe von primärem und sekundärem Sjögren-Syndrom lassen sich Leistungsinsuffizienz und Arthralgien ähnlich der zu erwartenden Größenordnung finden. Bei den übrigen Symptomen (Tab. 8) sind die Beschwerden deutlich stärker ausgeprägt, beim Raynaud-Phänomen sogar dreimal häufiger als nach der aktuellen Literatur zu erwarten wäre (Tab. 1) (Ramos-Casals et al. 2008). Betrachtet man nur die Patientengruppe des primären Sjögren-Syndroms, liegen auch diese mit ihren zusätzlichen Beschwerden über den in Tabelle 1 angegebenen Prävalenzen.

Antinukleäre Antikörper (ANA) können bei fast allen Patienten nachgewiesen werden, so auch im untersuchten Patientengut. Eine Assoziation mit den SS-A- und SS-B-Antikörpern ist ebenso offensichtlich. Erwartungsgemäß liegt die Prävalenz dieser AK beim Sjögren-Syndrom nur zwischen 50-60% (Ramos-Casals et al. 2008, Routsias & Tzioufos 2010) und konnte in unserer Untersuchung mit 69% annähernd bestätigt werden. Allerdings war der Nachweis mit 80% bei den sSS-Patienten gegenüber den pSS-Patienten mit 64% erhöht (Tab. 7).

Bei kritischer Betrachtung muss allerdings die kleine Zahl des Kollektivs berücksichtigt werden sowie die ausschließliche Auswertung an Hand der Krankenblätter. Die retrospektive Erhebung ließ insbesondere zu den subjektiv angegebenen Beschwerden keine Befragung zu. Die geringe Spezifität der Anti-SS-A- und Anti-SS-B-Antikörper sowie der ANA lassen gerade durch ihre Prävalenz bei anderen Autoimmunerkrankungen und den asymptomatischen Nachweis bei 1% der Bevölkerung keine alleinige Diagnose des Sjögren-Syndroms zu, insbesondere keine Differenzierung zwischen primärer und sekundärer Form der Erkrankung. Letztlich stimmen aber die klinischen und paraklinischen Befunde weitgehend mit den zu erwartenden Befunden überein (Routsias & Tzioufos 2010).

### 5.1.2 Entzündung und zelluläre Infiltration

Die histopathologische Untersuchung von Lippenschleimhautbiopsien ist eine wichtige Maßnahme im Rahmen der Diagnostik und Differentialdiagnose des Sjögren-Syndroms (Tab. 2). Die Destruktion der Speicheldrüsen ist die Ursache für den zunehmenden Funktionsverlust. Sie erfolgt durch infiltrierende T- und B-Zellen, die sich oft in einem aktivierten Zustand befinden (Lee et al. 2009). Die lymphozytären Infiltrate finden sich insbesondere im Bereich der Ausführungsgänge mit periduktaler Fibrose. Bei langen Verläufen der Erkrankung kann es dadurch zur massiven Zerstörung der Drüsen kommen, mit Atrophie des Drüsenparenchyms. An der Initiation der Destruktionsprozesse sind wahrscheinlich besonders die Th1-Zellen und das von ihnen produzierte Interferon- $\gamma$  beteiligt, indem sie die Produktion und Freisetzung von Komponenten des Plasminogen-Aktivierungssystems steigern (Gliozzi et al. 2013).

Als morphologische Besonderheit der Sialadenitis findet sich beim Sjögren-Syndrom der lymphozytäre Focus, ein Aggregat von mindestens 50 Lymphozyten und Histiozyten (Fox & Kong 1992, Fox 2005, Kassan & Moutsopoulos 2004, Krenn et al.

2010). Nur bei zwei Patienten, jeweils einer aus dem Kollektiv von pSS und sSS, waren deutlich ausgeprägte lymphozytäre Foci im untersuchten Gewebe nachweisbar. In den restlichen Präparaten waren nur geringe und mäßige Infiltrate vorhanden. Die Fibrosierung im Drüsengewebe war bei den SS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöht, aber zwischen den Patientengruppen gab es keine unterschiedliche Ausprägung. In gleicher Weise trifft dies für die Proliferations- und Apoptoseraten im Gewebe zu.

Vergleicht man das zelluläre Infiltrat beider Gruppen, so zeigt sich beim Nachweis von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bei den sSS-Patienten ein etwas erniedrigter Score gegenüber dem pSS, der allerdings keine Signifikanz erreichte. Bei allen anderen zellulären Markern, die geprüft wurden, gab es keine Unterschiede zwischen den zwei Patientengruppen, im Vergleich zu den Kontrollen waren sie aber signifikant stärker ausgeprägt. Auffällig ist bei unseren Patienten die im Vergleich zu Literaturdaten geringere Zahl an B-Zellen/Plasmazellen (ca. 10%). Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung des zellulären Infiltrates stark von der Schwere der Läsionen abhängig ist und dass besonders die B-Zellen mit Zunahme der Entzündung ansteigen (Christodoulou et al. 2010). Da in unseren Patienten die Infiltration meistens nur schwach war, könnte dies die Ursache für diesen Befund sein.

## **5.2 NOD-Mäuse**

### **5.2.1 Entzündung und zelluläre Infiltration**

Die histologischen Veränderungen in den Speicheldrüsen beginnen nach etwa 8 Wochen und sind durch Infiltration von Entzündungszellen mit fokaler Ansammlung gekennzeichnet. Die Struktur und zelluläre Zusammensetzung dieser Foci ähnelt denen, die in den Speicheldrüsen von SS-Patienten vorkommen (Review: Voulgarelis & Tzioufas 2010). Die Aktivierung dendritischer Zellen im Drüsengewebe wird für das Einwandern und die Akkumulation von Entzündungszellen verantwortlich gemacht (van Blokland et al. 2000, Wildenberg et al. 2009). In den fokalen Infiltraten dominieren T-Zellen und eine geringere Zahl an B-Zellen sowie einzelne Makrophagen, NK-Zellen und dendritische Zellen. Zuerst infiltrieren dabei CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, später kommen die anderen mononukleären Zellen hinzu, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen (Robinson et al. 1998a). Außerdem kommt es zur Atrophie der azinären Epithelzellen und zu einer fortschreitenden Fibrosierung des Drüsengewebes. In deren Folge kommt es zu Einschränkungen bis hin zum völligen

Verlust der Funktion bestimmter exokriner Drüsen, besonders der Speicheldrüsen. Charakteristisches Merkmal dafür ist eine verringerte Speichelproduktion (Hyposalivation).

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Entzündung mit der Infiltration von T-Zellen ( $CD3^+$  Zellen) beginnt. Bei 6 Wochen alten Tieren war noch kein entzündliches Infiltrat vorhanden, aber nach 12 Wochen waren erste T-Zellen nachweisbar, die danach weiter anstiegen. Es handelte sich vorwiegend um  $CD4^+$  T-Helferzellen, während  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen nur in sehr geringer Zahl vorkamen. Nach 24 Wochen waren auch B-Zellen nachweisbar und stiegen danach weiter an. Makrophagen waren in geringer Zahl ab der 12. Woche im Infiltrat vorhanden und stiegen bis zur 24. Woche weiter an. Nach 36 Wochen war die Zahl der Makrophagen dann wieder gering. Parallel zur Entzündung nahmen auch die Fibrosierung des Gewebes sowie die Proliferations- und Apoptoseraten in den Drüsen zu.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Inzidenz der Erkrankung bei 100% lag und dass alle diese Veränderungen in männlichen Tieren eher begannen und auch stärker waren als in weiblichen Tieren. Dies steht im Gegensatz zum Diabetes, bei dem die weiblichen Tiere eher erkranken und mit einer Inzidenz von 60-80% stärker betroffen sind als die männlichen Tiere, von denen nur 20-30% erkranken (Anderson & Bluestone 2005). Darauf wird im Abschnitt 5.2.5 nochmals näher eingegangen.

### 5.2.2 Bedeutung der Zytokine

Zytokine spielen in der gesamten Pathogenese des Entzündungsgeschehens eine maßgebliche Rolle. Aus diesem Grund ist auch in Speicheldrüsen von NOD-Mäusen die Zytokinexpression auf mRNA- und Proteinebene bereits intensiv untersucht worden. Wenn die Befunde teilweise auch recht heterogen sind, zeigt sich in den Drüsen von Tieren ab einem Alter von 8 Wochen eine Zunahme der Expression der proinflammatorischen Zytokine  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$  und  $IFN-\gamma$ , während die Th2-Zytokine  $IL-4$  und  $IL-5$  meistens nicht nachweisbar waren (Robinson et al. 1998a, Yanagi et al. 1998, Yamano et al. 1999, Delaleu et al. 2008). Die Zytokine sind vorwiegend in den Lymphozytenaggregaten nachweisbar, aber auch in azinären Epithelzellen und im Stroma und dort sogar, bevor es zur Lymphozyteninfiltration kommt (Fox et al. 1994, Yamakawa et al. 2000). Dies könnte bei der Initiation der



Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen. Die Bedeutung einzelner Zytokine im gesamten Pathogeneseprozess wird vorwiegend an genetisch veränderten Tieren untersucht, bei denen ein bestimmtes Zytokinen ausgeschaltet (Knockout-Mäuse) bzw. zusätzlich eingeführt wurde (transgene Tiere), so dass das Zytokin entweder fehlt oder verstärkt exprimiert wird. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$ - und IFN- $\gamma$ -Rezeptor-defiziente NOD-Mäuse weder Sialoadenitis noch Hyposalivation entwickeln (Kong et al. 1998, Cha et al. 2004), während in IL-4-defizienten NOD-Mäusen die Infiltration der Drüsen zwar stattfindet, die sekretorische Funktion aber erhalten bleibt (Gao et al. 2006, Nguyen et al. 2007). Die Neutralisation von IL-2 wiederum verstärkt die autoimmunen Reaktionen in NOD-Mäusen (Setoguchi et al. 2005) und IL-2-defiziente C57Bl/6-Mäuse entwickeln SS-ähnliche Symptome mit Entzündung und funktioneller Beeinträchtigung der Speicheldrüsen (Sharma et al. 2006). Da IL-2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) spielt, wird angenommen, dass es durch den IL-2-Mangel zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung von Treg-Zellen kommt (De Paiva et al. 2010). Allerdings wurde bei NOD-Mäusen kein genereller Defekt der Treg-Zellen gefunden (Feuerer et al. 2007, Mellanby et al. 2007, D'Alise et al. 2008, 2011), eher ein defizitäres APC-System (Alard et al. 2006, Manirarora et al. 2008, Tonkin et al. 2008). SS-ähnliche Entzündungen der Speicheldrüsen mit funktioneller Schädigung können auch durch transgene Überexpression von IL-10 (Saito et al. 1999) oder IL-12 (Vosters et al. 2009a) induziert werden. Durch IL-10 wird die Fas/FasL-vermittelte Apoptose induziert und damit die Gewebedestruktion unterstützt, während IL-12 die Th1-Polarisierung und Autoantikörperbildung fördert. Für TNF wurde gezeigt, dass durch Blockade des Lymphotoxin  $\beta$ -Rezeptors die Entzündung der Speicheldrüsen reduziert wird (Gatumu et al. 2009), durch Hemmung des TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) dagegen die funktionellen Ausfälle verstärkt werden (Vosters et al. 2009b). In aktuellen Untersuchungen wird besonders die Bedeutung der Th17-Zellen hervorgehoben. So konnte gezeigt werden, dass in den Speicheldrüsen von NOD-Mäusen, aber auch bei SS-Patienten, das Th17/IL-23-System aktiviert ist (Nguyen et al. 2008, Sakai et al. 2008, Katsifis et al. 2009). Durch den adenovirus-induzierten Transfer von IL-17 in Speicheldrüsen von nicht-suszeptiblen C57Bl/6-Mäusen können SS-ähnliche Symptome induziert werden (Nguyen et al. 2009), während die gentherapeutische Blockade des IL-17R in den Speicheldrüsen von NOD-Mäusen die Entzündung und die funktionellen Defekte

effektiv hemmt (Nguyen et al. 2011). In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass das proinflammatorische Zytokin IL-17 im Verlauf der Erkrankung in geringen Mengen bereits sehr zeitig im Drüsenstroma und in Epithelzellen der Drüsengänge vorkommt. Bei 24 und 36 Wochen alten Tieren wird IL-17 dann auch verstärkt in den zellulären Infiltraten gefunden, bei männlichen Tieren signifikant stärker als in Weibchen. Diese Daten zeigen, dass sowohl Th1-Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12), Th2-Zytokine (IL-4) und Th17-Zytokine (IL-17, IL-23) für die Entwicklung und die klinische Manifestation der autoimmunen Erkrankung in NOD-Mäusen wichtig sind. Unklar bleibt allerdings, auf welche Art und Weise die Zytokine die Krankheitsentwicklung konkret beeinflussen. Außerdem können einzelne Zytokine auch unterschiedliche Rollen in der Pathogenese des Diabetes und des Sjögren-Syndroms spielen. So entwickeln IL-10-defiziente NOD-Mäuse das typische SS-ähnliche Krankheitsbild (Cha et al. 2002), während die Entwicklung des Diabetes durch IL-10 beschleunigt wird (Wogensen et al. 1994), eine bereits etablierten Erkrankung sich aber verbessert (Zheng et al. 1997). Eine IL-4-Defizienz dagegen beeinflusst zwar die Entwicklung der SS-ähnlichen Erkrankung in NOD-Mäusen (Gao et al. 2006, Nguyen et al. 2007), hat aber keinerlei Einfluss auf die Entstehung des Diabetes (Wang et al. 1998).

### 5.2.3 Die besondere Bedeutung von IL-7

IL-7 ist ein ganz wichtiges Zytokin für die Entwicklung und Differenzierung von Thymozyten und T-Zellen, für das Überleben der T-Zellen in der Peripherie und für die Erhaltung der Homöostase des T-Zell-Kompartiments (Kondrack et al. 2003, Seddon et al. 2003, Jiang et al. 2005, Surh & Sprent 2008, Pearson et al. 2011). Die Differenzierung und Funktion bestimmter Subsets von Effektor-T-Zellen können dabei besonders gefördert werden, z.B. von IFN- $\gamma$ -produzierenden Th1-Zellen oder IL-17-produzierenden Th17-Zellen (Park et al. 2010, Sprent & Surh 2011) und regulatorischen T-Zellen (Kim et al. 2012). Neben diesen wichtigen Funktionen fördert IL-7 aber auch das Überleben von autoreaktiven T-Zellen und kann somit zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen (Watanabe et al. 1998, Calzascia et al. 2008). Außerdem ist IL-7 an der Entwicklung von follikulären Lymphozytenaggregaten in chronisch entzündeten Geweben beteiligt, einer Struktur, die für bestimmte Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem primärem Sjögren-Syndrom typisch ist. Bei RA-Patienten wurde im entzündeten

Synovialgewebe, die solche ektopischen Lymphfollikel enthalten, eine erhöhte Expression der Gene für IL-7, der IL-7-Rezeptorketten und des IL-7-Signaling gefunden (Timmer et al. 2007). IL-7 selbst war dabei in synovialen Fibroblasten, Makrophagen und in Endothelzellen nachweisbar. An der Bildung von Lymphknoten, aber auch von tertiären Lymphoidstrukturen sind sog. Lymphoid-Tissue-Inducer-Zellen beteiligt, die den IL-7-Rezeptor exprimieren (Meier et al. 2007). IL-7 erhöht das Überleben dieser Inducer-Zellen und unterstützt damit die Bildung von Lymphfollikeln in den entzündeten Geweben.

Der Rezeptor für IL-7 ist ein Heterodimer, das aus einer spezifischen  $\alpha$ -Kette (IL-7R $\alpha$ ) und einer gemeinsamen  $\gamma$ -Kette, die auch in verschiedenen anderen Zytokinrezeptoren vorkommt (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21), besteht (Goodwin et al. 1990, Leonard et al. 1995, Jiang et al. 2005).

IL-7 wird von verschiedenen Zellen produziert, hauptsächlich von mesenchymalen Stromazellen (Sudo et al. 1989, Watanabe et al. 1992, Jiang et al. 2005), aber auch von Macrophagen, Keratinozyten, dendritischen Zellen, endothelialen Zellen und Epithelzellen unterschiedlicher Herkunft (Heufler et al. 1993, Watanabe et al. 1995, Madrigal-Estebas et al. 1997, Hara et al. 2012, Shitara et al. 2013). Als Trigger für die IL-7-Produktion wurden verschiedene Stimuli identifiziert, wie aktivierte T-Zellen, Liganden von Toll-like Rezeptoren, proinflammatorische Mediatoren aus infektiösen Agenzien und Umweltfaktoren (van Roon et al. 2013). Dabei handelt es sich um Faktoren, von denen auch wichtige Rolle in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms angenommen wird, die exakten Mechanismen der IL-7-Induktion bei Autoimmunerkrankungen sind allerdings noch nicht aufgeklärt.

Beim primären Sjögren-Syndrom konnte eine erhöhte Expression von IL-7 im Gewebe der labialen Speicheldrüsen nachgewiesen werden, die mit den lokalen und peripheren Krankheitsparametern korreliert (Bikker et al. 2010). Außerdem ist die Zahl der T-Zellen erhöht, die den IL-7-Rezeptor- $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) exprimieren (Bikker et al. 2012a). In mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut von pSS-Patienten stimuliert IL-7 die Produktion proinflammatorischer Th1- und Th17-Zytokine, von denen bekannt ist, dass sie in die Pathogenese der Erkrankung involviert sind (Bikker et al. 2010, 2012b).

Wir konnten zeigen, dass IL-7 bereits bei 6 Wochen alten NOD-Mäusen in geringen Mengen im Drüsenstroma nachweisbar ist, also noch bevor eine zelluläre Infiltration stattfindet, und danach bis zur 24. Woche anstieg, dabei besonders stark in

männlichen Tieren. Bis zur 36. Woche verblieben die IL-7-Level im Drüsengewebe relativ hoch, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Besonders der Nachweis von IL-7 vor Beginn der zellulären Infiltration lässt vermuten, dass dieses Zytokin an der Initiation der Infiltration von T-Zellen in das Drüsengewebe maßgeblich beteiligt ist. Dafür sprechen auch ganz aktuelle Untersuchungen am Modell der C57BL/6.NOD-*Aec1Aec2*-Maus (Jin et al. 2013). Diese Autoren zeigten, dass mit einem Antikörper gegen den IL-7R $\alpha$  das Entzündungsgeschehen in den Speicheldrüsen und der Funktionsverlust sowie die Produktion von Autoantikörpern effektiv gehemmt werden können, während die Applikation von rekombinantem IL-7 das Krankheitsgeschehen verstärkte. Durch IL-7 werden in den Speicheldrüsen IFN- $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktiviert, die Expression von CXCR3-Liganden auf epithelialen Zellen erhöht, die Apoptoseraten verstärkt und die Bildung von TNF $\alpha$  gesteigert, alles Prozesse, die maßgeblich zur Entzündung und Gewebsdestruktion beitragen. Durch den Antikörper werden IL-7R $\alpha$ -exprimierende autoreaktive Effektor-/ Memory-T-Zellen wirksam gehemmt, wodurch die Entwicklung des autoimmunen Krankheitsgeschehens verhindert oder verringert wird.

In NOD-Mäusen konnten in ähnlicher Weise durch die Applikation eines Antikörpers gegen den IL-7R $\alpha$  die Entstehung des autoimmunen Diabetes komplett verhindert und – sicherlich noch wichtiger – ein bereits bestehender Diabetes zur Remission gebracht werden (Lee et al. 2012, Penaranda et al. 2012). In beiden Arbeiten wurde gezeigt, dass durch die Blockade des IL-7-Signaling in den diabetogenen T-Zellen der inhibitorische Rezeptor Programmed Death-1 (PD-1) induziert wird, was zur Verringerung des autoaggressiven Potenzials dieser Zellen führt. PD-1 ist ein sehr potenter Inhibitor der Effektorfunktion von T-Zellen (Ansari et al. 2003, Barber et al. 2006). Die autoreaktiven T-Zellen werden dabei nicht depletiert, sondern in einen ruhenden, inaktiven Zustand überführt. IL-7 und PD-1 haben somit bei der Regulation von Immunreaktionen antagonistische Wirkungen. Die Autoren zeigten sehr klar, dass IL-7 die PD-1-Expression auf den Effektor-/Memory-T-Zellen supprimiert, während die Blockade des IL-7R $\alpha$  die Expression von PD-1 fördert. Außerdem wird durch diese Blockade die Frequenz der regulatorischen T-Zellen erhöht, was ebenfalls zur Hemmung von autoaggressiven T-Zellen beitragen könnte. Eine Hemmung des autoimmunen Geschehens mit einem Antikörper gegen den IL-7R $\alpha$  wurde auch im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (Hartgring et al. 2010) und bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, einem Modell der

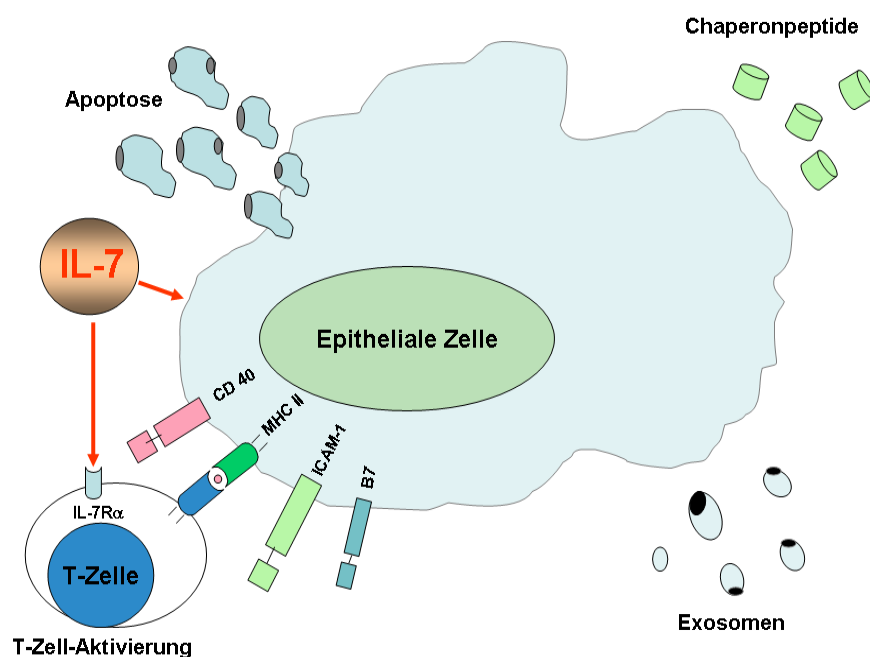
multiplen Sklerose, erreicht (Lee et al. 2011). Die IL-7R $\alpha$ -Blockade könnte somit ein sehr effizienter Ansatz für die Therapie von T-Zell-abhängigen Autoimmunerkrankungen sein, allerdings muss sehr sorgfältig abgeklärt werden, inwieweit durch eine solche Blockade die Suszeptibilität für bestimmte Infektionen oder sogar für Krebs erhöht wird (Mackall et al. 2011, Boettler & von Herrath 2012).

#### 5.2.4 Rolle der Epithelzellen

Die epithelialen Zellen nehmen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms ein, indem sie Prozesse der angeborenen (innate) Immunität mit denen der erworbenen (adaptiven) Immunität verbinden. Dies konnte bereits in zahlreichen Untersuchungen belegt werden (Moutsopoulos 1994, Manoussakis & Kapsogeorgou 2007, 2010, Voulgarelis & Tzioufas 2010, Mavragani & Moutsopoulos 2014). Initial wird die Aktivierung und Schädigung der glandulären Epithelien durch exogene Stimuli angenommen, z.B. durch virale oder andere Infektionen, was zur Aktivierung des MHC-unabhängigen angeborenen Immunsystems führt. Dabei werden zahlreiche immunreaktive Moleküle exprimiert, die in die Prozesse der Antigen-erkennung und -präsentation, der Kostimulation, Zelladhäsion und Zellmigration und der Apoptose einbezogen sind. Außerdem werden Toll-like Rezeptoren (TLR) exprimiert (Spachidou et al. 2007), die konservierte molekulare Muster erkennen, sog. PAMP (pathogen-associated molecular pattern), die in vielen Mikroorganismen und Apoptoseprodukten vorkommen. Durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wird so ein inflammatorisches Milieu geschaffen, wodurch die Infiltration von T- und B-Zellen induziert wird. Damit werden die Prozesse der MHC-abhängigen erworbenen Immunität in das Krankheitsgeschehen einbezogen. Die Präsentation von Antigenen in Gegenwart von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen führt zur Aktivierung von T- und B-Zellen und manifestiert damit das Entzündungsgeschehen. Die Sekretion des B-Zell-stimulierenden Faktors BAFF fördert maßgeblich die Aktivierung und das Überleben der B-Zellen und induziert die Produktion von Antikörpern einschließlich der bekannten Palette an Autoantikörpern (Ittah et al. 2006, Daridon et al. 2007). Auf diese Weise wird der Circulus vitiosus einer chronischen Entzündung und Gewebsschädigung entwickelt und aufrechterhalten.

Wie bereits im Abschnitt 5.2.3 dargestellt wurde, spielt IL-7 bei der Induktion der pathologischen Veränderungen in den Speicheldrüsen eine wichtige Rolle. IL-7 ist

auch an der Aktivierung der glandulären Epithelzellen beteiligt, wie u.a. die erhöhte Expression von CXCR3-Liganden, die verstärkten Apoptoseraten und eine vermehrte Bildung von  $\text{TNF-}\alpha$  zeigen (Jin et al. 2013, van Roon et al. 2013). Wir konnten bereits bei 6 Wochen alten NOD-Mäusen IL-7 in den submandibulären Speicheldrüsen nachweisen. Das bedeutet, dass IL-7 für die Aktivierung von Epithelzellen zur Verfügung steht, bevor die zelluläre Infiltration beginnt. IL-7 wird dabei vorwiegend von mesenchymalen Stromazellen gebildet und die dafür verantwortlichen Stimuli sind weitgehend mit denen identisch, die auch für die Aktivierung der epithelialen Zellen in der initialen Phase der Pathogenese des Sjögren-Syndroms angenommen werden. Aktivierte Epithelzellen sezernieren dann proinflammatorische Zytokine, wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IL-17}$  (Fox et al. 1994, Yamakawa et al. 2000, Nguyen et al. 2008). Die Expression von  $\text{IL-17}$  in den glandulären Epithelzellen konnte in der vorliegenden Arbeit auch für das NOD-Modell bestätigt werden. Mit ihren MHC II-Molekülen können die Epithelzellen auch Antigene präsentieren und zusammen mit Kostimulatoren T-Zellen aktivieren. In Anwesenheit von IL-7 wird besonders die Aktivierung von  $\text{IL-7R}\alpha$ -exprimierenden T-Zellen gefördert (Abb. 15).



**Abb. 15.** Mögliche Funktionen von glandulären Epithelzellen im Pathogeneseprozess des Sjögren-Syndroms. Die Epithelzellen werden u.a. durch IL-7 aktiviert und können mittels MHC II-Moleküle Antigene präsentieren und zusammen mit Kostimulatoren (B7, ICAM-1, CD40) T-Zellen aktivieren. In Anwesenheit von IL-7 wird besonders die Aktivierung von  $\text{IL-7R}\alpha$ -positiven T-Zellen gefördert. Via Freisetzung apoptotischer Blebs und Bodies könnten so auch Autoantigene präsentiert werden (modifiziert nach Routsias & Tzioufas 2010).

Es wurde gezeigt, dass IL-7R $\alpha$ -positive Zellen stark proliferierende Effektor-T-Zellen sind, die auf IL-7-Stimulation, selbst in Gegenwart von regulatorischen T-Zellen, mit einer starken Produktion von Th1- und Th17-Zytokinen reagieren (Jin et al. 2013, van Roon et al. 2013). Auf diese Weise werden die adaptiven Immunmechanismen in die Entwicklung des Entzündungsgeschehens in den Speicheldrüsen einbezogen.

#### 5.2.5 Einfluss des Geschlechts

Die erhöhte Inzidenz des Sjögren-Syndroms in Frauen und der gehäufte Beginn nach der Menopause sind deutliche Hinweise dafür, dass Hormone eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung spielen. Es wird angenommen, dass estrogene Wirkungen dafür verantwortlich sind, aber die Rolle der Estrogene bei Autoimmunprozessen ist bisher nicht gut aufgeklärt (Konttinen et al. 2012, Mavragani & Moutsopoulos 2014). Die epidemiologischen Daten werden durch experimentelle Befunde unterstützt. So entwickeln gesunde normale weibliche Mäuse nach Entfernung der Ovarien SS-ähnliche autoimmune Symptome, wie Exokrinopathie, Autoantikörperbildung und Infiltration und Destruktion der Speichel- und Tränendrüsen (Ishimaru et al. 1999, 2003). Durch exogene Gabe von Estrogenen kann dies reduziert oder verhindert werden. Verantwortlich ist dafür anscheinend eine durch Estrogenmangel bedingte erhöhte Apoptose in den Epithelien der Drüsen (Ishimaru et al. 2003, 2006, 2008, Konttinen et al. 2012). Estrogene haben demnach eine protektive Rolle bei der Entwicklung der SS-ähnlichen Erkrankung.

Im NOD-Modell allerdings ist, wie auch beim Diabetes, die Inzidenz und Schwere der pathologischen Veränderungen in weiblichen Mäusen normalerweise größer als in männlichen Tieren (Toda et al. 1999, von Blokland & Versnel 2002, Anderson & Bluestone 2005). Dies kann nicht mit einem Mangel an Estrogenen erklärt werden. Im Modell der NOD.H2<sup>h4</sup> Maus, die durch die Veränderung des genetischen Hintergrunds (H2<sup>h4</sup> statt H2<sup>g7</sup>) keinen Diabetes bekommt, aber die SS-ähnlichen Symptome entwickelt, wird dafür die Modulation der lokalen Immunreaktivität verantwortlich gemacht, weil in weiblichen Tieren die infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mehr Th2- und Th17-Zytokine produzieren, während in männlichen Tieren eine stärkere Th1-Reaktivität vorhanden ist (Ciháková et al. 2009). Im Modell der C57BL/6.NOD-*Aec1Aec2*-Maus allerdings entwickeln männliche Tiere das volle Bild der SS-ähnlichen Erkrankung, während weibliche Tiere nur sehr gering reagieren (Nguyen et

al. 2006b). In unseren Untersuchungen war die Inzidenz der Erkrankung mit 100% in beiden Geschlechtern zwar gleich, aber die pathologischen Veränderungen in den Speicheldrüsen traten bei männlichen Tieren eher auf und waren schwerer als in Weibchen. Die dafür verantwortlichen Mechanismen bleiben ungeklärt. Allerdings gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die zeigen, dass sich die NOD-Stämme über einen längeren Zeitraum verändern können (Lodde et al. 2006, Roescher et al. 2012) und dass exogene Faktoren die Reaktivität der Versuchstiere beeinflussen, wahrscheinlich hauptsächlich über die Modulation der Immunbalance (Alam et al. 2011, Delaleu et al. 2011). Dies könnte auch für den von uns verwendeten Stamm zutreffen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Inzidenz für den Diabetes am höchsten ist, wenn die Tiere keimfrei gehalten werden und sich unter konventionellen („schmutzigen“) Bedingungen dramatisch verringert (Singh & Rabinovitch 1993, Anderson & Bluestone 2005).

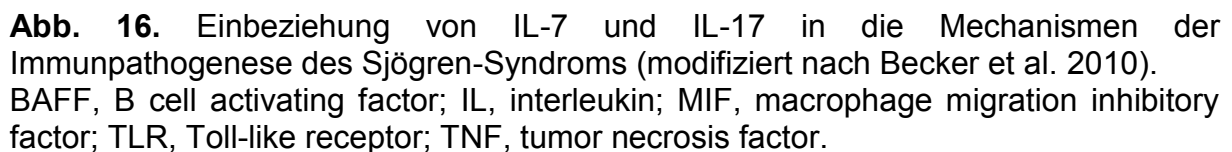
### **5.3 Pathogenese**

Das bereits in der Einleitung vorgestellte Konzept der Pathogenese des Sjögren-Syndroms kann durch neue experimentelle Befunde einschließlich der hier vorgestellten Daten ergänzt werden. Das betrifft zum einen den bereits oben beschriebenen Nachweis von IL-7 und von IL-7R $\alpha$ -exprimierenden T-Zellen in den labialen Speicheldrüsen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom, deren funktionelle Charakterisierung und die Korrelationen mit dem Krankheitsgeschehen (Bikker et al. 2010, 2012a). Zum anderen kann im experimentellen Modell der C57BL/6.NOD-Aec1Aec2-Maus durch Applikation von IL-7 die Erkrankung verstärkt und mit einem Antikörper gegen den IL-7R $\alpha$  nahezu komplett verhindert werden (Jin et al. 2013). Im Modell der NOD-Maus konnten wir zeigen, dass bereits sehr zeitig, noch bevor überhaupt eine zelluläre Infiltration stattfindet, IL-7 im Drüsengewebe vorhanden ist. Diese Befunde unterstreichen die wichtige Bedeutung von IL-7 für die Initiation und Entwicklung des Sjögren-Syndroms und der SS-ähnlichen Erkrankung in den verschiedenen Modellen (Abb. 16).

IL-7 ist wahrscheinlich an der initialen Aktivierung der glandulären Epithelzellen beteiligt, wie u.a. die erhöhte Expression von CXCR3-Liganden, die verstärkten Apoptoseraten und eine vermehrte Bildung von TNF- $\alpha$  zeigen (Jin et al. 2013, van Roon et al. 2013). Außerdem aktiviert IL-7 in der frühen Phase der zellulären Infiltration, wenn noch keine B-Zellen vorhanden sind, vor allem autoreaktive IL-7R $\alpha$ -



**Abb. 16.** Einbeziehung von IL-7 und IL-17 in die Mechanismen der Immunpathogenese des Sjögren-Syndroms (modifiziert nach Becker et al. 2010). BAFF, B cell activating factor; IL, interleukin; MIF, macrophage migration inhibitory factor; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.



## 5.4 Schlussfolgerungen

Für die Therapie des primären Sjögren-Syndroms existieren bisher keine EULAR- oder AWMF-Leitlinien. Die Behandlung erfolgt hauptsächlich supportiv durch ausreichende Flüssigkeitszufuhr während der Nahrungsaufnahme und durch die Gabe von Tränenersatzflüssigkeit zu Milderung der Sicca-Symptomatik. Diese Standardtherapien können z.B. durch Luftbefeuchtung und Nasenöle unterstützt werden. Während entzündlicher Schübe ist die orale Applikation von Kortikosteroiden, nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) oder Cyclooxygenase-Inhibitoren etabliert. In einer Übersichtsarbeit von Ramos-Casals et al. (2010) konnte bei den verschiedenen neuen Therapieansätzen lediglich eine klinische Wirksamkeit von topischem Ciclosporin A und dem Einsatz von Pilocarpin nachgewiesen werden, weniger für das häufig eingesetzte Prednisolon oder auch Hydrochlorochin. Eine Immunsuppression ist bei bestimmten extraglandulären Manifestationen indiziert, wie interstitielle Lungenerkrankungen, Vaskulitis und der beim Sjögren-Syndrom seltenen Glomerulonephritis. Trotz unser immer detaillierteren Kenntnisse über die Bedeutung von Zytokinen und deren Rezeptoren in der Pathogenese des Sjögren-Syndroms haben die klinischen Studien mit den sog. Biologicals bisher nicht die Erwartungen erfüllt (Feist et al. 2007, Ramos-Casals et al. 2012, Fox & Fox 2013). Neuere Studien mit dem B-Zell-depletierenden Antikörper Rituximab zeigten gewisse Verbesserungen von funktionellen, subjektiven und Laborparametern, aber die Langzeitwirkung der Therapie ist noch nicht bekannt (Meijer et al. 2010, Puéchal et al. 2012). Der Einsatz der TNF-Antagonisten Infliximab und Etanercept führte in den bisherigen retrospektiven Studien zu keinem eindeutigen Benefit, so dass hier randomisierte prospektive Studien abgewartet werden müssen, die allerdings immer noch fehlen (Feist et al. 2007, Kötter & Henes 2013). Für die Behandlung des primären Sjögren-Syndroms, welches so nachhaltig die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigt und das Risiko für B-Zell-Lymphome deutlich erhöht, wird demnach dringend eine Erweiterung und Verbesserung des therapeutischen Arsenalts benötigt. Ein besseres Verständnis der Pathogenese des Sjögren-Syndroms ermöglicht hier vielleicht zukünftig neue therapeutische Ansätze. Die Kenntnis des früh vorhandenen IL-7 in den submandibularen Speicheldrüsen der NOD-Mäuse, bereits bevor eine zelluläre Infiltration nachweisbar ist, lässt eine wichtige Funktion dieses Zytokins bei der Induktion der inflammatorischen Kaskade annehmen und könnte deshalb ein solcher Ansatzpunkt sein. Dafür sprechen auch die eindrucksvollen Effekte der Blockade des

IL-7-Signaling beim autoimmunen Diabetes in der NOD-Maus (Lee et al. 2012, Penaranda et al. 2012). Mit einem Antikörper gegen den IL-7-Rezeptor konnte hier nicht nur die Entwicklung eines Diabetes verhindert werden, sondern sogar ein bereits bestehender Diabetes geheilt werden. Für die klinische Situation wäre dies natürlich von ganz wesentlicher Bedeutung. Allerdings müssen bei solchen Ansätzen immer die potentiellen Risiken und klinischen Benefits sorgfältig abgeklärt und berücksichtigt werden. Die Erwartungen und Hoffnungen der Patienten und der behandelnden Ärzte in diese aktuellen Entwicklungen sind jedenfalls enorm und nachvollziehbar.

## 6 Literaturverzeichnis

Alam C, Bittoun E, Bhagwat D, Valkonen S, Saari A, Jaakkola U, Eerola E, Huovinen P, Hänninen A. Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia*. 2011;54:1398-1406.

Alard P, Manirarora JN, Parnell SA, Hudkins JL, Clark SL, Kosiewicz MM. Deficiency in NOD antigen-presenting cell function may be responsible for suboptimal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell-mediated regulation and type 1 diabetes development in NOD mice. *Diabetes*. 2006;55:2098-2105.

Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-485.

Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med*. 1978;148:1198-1215.

Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R257.

Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, Yamazaki T, Azuma M, Iwai H, Khoury SJ, Auchincloss H Jr, Sayegh MH. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*. 2003;198:63-69.

Aqrabi LA, Brokstad KA, Jakobsen K, Jonsson R, Skarstein K. Low number of memory B cells in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity*. 2012a;45:547-555.

Aqrabi LA, Skarstein K, Bredholt G, Brun JG, Brokstad KA. Autoantigen-specific memory B cells in primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2012b;75:61-68.

Arendt WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001;45:101-106.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281:1305-1308.

Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Harada K, Hayashi Y, Sato M. Suppression of tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase 9 production by the introduction of a super-repressor form of inhibitor of nuclear factor kappaBalpha complementary DNA into immortalized human salivary gland acinar cells. Prevention of the destruction of the acinar structure in Sjögren's syndrome salivary glands. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1756-1767.

Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Ashida Y, Hayashi Y, Sato M. Suppression of tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-

regulation of nuclear factor kappaB: a possible therapeutic agent for preventing the destruction of the acinar structure in the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1585-1594.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439:682-687.

Basbaum CB, Werb Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:731-738.

Becker H, Pavenstaedt H, Willeke P. Emerging treatment strategies and potential therapeutic targets in primary Sjögren's syndrome. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010;9:10-19.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T<sub>H</sub>17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T<sub>H</sub>17 cells. *Nature* 2008;453:1051-1057.

Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2010;62:2192-2205.

Bikker A, van Woerkom JM, Kruize AA, Wenting-van Wijk M, de Jager W, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA. Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome correlates with increased inflammation. *Arthritis Rheum.* 2010;62:969-977.

Bikker A, Kruize AA, Wenting M, Versnel MA, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA. Increased interleukin (IL)-7R $\alpha$  expression in salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome is restricted to T cells and correlates with IL-7 expression, lymphocyte numbers and activity. *Ann Rheum Dis.* 2012a;71:1027-1033.

Bikker A, Moret FM, Kruize AA, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA. IL-7 drives Th1 and Th17 cytokine production in patients with primary SS despite an increase in CD4 T cells lacking the IL-7R $\alpha$ . *Rheumatology (Oxford).* 2012b;51:996-1005.

Billroth GT. Über eine eigenartige symmetrische Erkrankung der Tränen- und Mundspeicheldrüsen. *Beitr Chir Fortschr.* Stuttgart 1892

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:728-735.

Bloch KJ, Buchanan WW, Wohl MJ, Bunim JJ. Sjogren's syndrome: A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases. *Medicine (Baltimore).* 1965;44:187-231.

Boettler T, von Herrath M. IL-7 receptor  $\alpha$  blockade, an off-switch for autoreactive T cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2012;109:12270-12271.

Brayer J, Lowry J, Cha S, Robinson CP, Yamachika S, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Alleles from chromosomes 1 and 3 of NOD mice combine to influence Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Rheumatol*. 2000;27:1896-1904.

Brayer JB, Cha S, Nagashima H, Yasunari U, Lindberg A, Diggs S, Martinez J, Goa J, Humphreys-Beher MG, Peck AB. IL-4-dependent effector phase in autoimmune exocrinopathy as defined by the NOD.IL-4-gene knockout mouse model of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2001;54:133-140.

Brookes SM, Cohen SB, Price EJ, Webb LM, Feldmann M, Maini RN, Venables PJ. T cell clones from a Sjögren's syndrome salivary gland biopsy produce high levels of IL-10. *Clin Exp Immunol*. 1996;103:268-272.

Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, Dayer JM. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1748-1759.

Calzascia T, Pellegrini M, Lin A, Garza KM, Elford AR, Shahinian A, Ohashi PS, Mak TW. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:2999-3004.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992;168:357-363.

Cawston TE. Proteinases and inhibitors. *Br Med Bull*. 1995;51:385-401.

Cha S, Nagashima H, Peck AB, Humphreys-Beher MG. IDD3 and IDD5 alleles from NOD mice mediate Sjögren's syndrome-like autoimmunity. *Adv Exp Med Biol*. 2002a;506:1035-1039.

Cha S, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Progress in understanding autoimmune exocrinopathy using the non-obese diabetic mouse: an update. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002b;13:5-16.

Cha S, Brayer J, Gao J, Brown V, Killedar S, Yasunari U, Peck AB. A dual role for interferon-gamma in the pathogenesis of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in the nonobese diabetic mouse. *Scand J Immunol*. 2004;60:552-565.

Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease. *J Clin Pathol*. 1968;21: 656-660.

Chiorini JA, Cihakova D, Ouellette CE, Caturegli P. Sjögren syndrome: advances in the pathogenesis from animal models. *J Autoimmun*. 2009;33:190-196.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Foxp3+ T-regulatory cells in Sjogren's syndrome: correlation with the grade of the autoimmune lesion and certain adverse prognostic factors. *Am J Pathol.* 2008;173:1389-1396.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010;34:400-407.

Ciháková D, Talor MV, Barin JG, Baldeviano GC, Fairweather D, Rose NR, Burek CL. Sex differences in a murine model of Sjögren's syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:378-383.

Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG. Human dermal endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol.* 1995;105:170-176.

D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C, Mathis D. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:19857-19862.

D'Alise AM, Ergun A, Hill JA, Mathis D, Benoist C. A cluster of coregulated genes determines TGF-beta-induced regulatory T-cell (Treg) dysfunction in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:8737-8742.

Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schiødt M, Wu A, Lanfranchi H, Umehara H, Zhao Y, Challacombe S, Lam MY, De Souza Y, Schiødt J, Holm H, Bisio PA, Gandolfo MS, Sawaki T, Li M, Zhang W, Varghese-Jacob B, Ibsen P, Keszler A, Kurose N, Nojima T, Odell E, Criswell LA, Jordan R, Greenspan JS. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjögren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2021-2030.

Daridon C, Devauchelle V, Hutin P, Le Berre R, Martins-Carvalho C, Bendaoud B, Dueymes M, Saraux A, Youinou P, Pers JO. Aberrant expression of BAFF by B lymphocytes infiltrating the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1134-1144.

Delaleu N, Immervoll H, Cornelius J, Jonsson R. Biomarker profiles in serum and saliva of experimental Sjögren's syndrome: associations with specific autoimmune manifestations. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R22.

Delaleu N, Nguyen CQ, Peck AB, Jonsson R. Sjögren's syndrome: studying the disease in mice. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:217.

Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002;102:4489-4500.

Deshmukh US, Ohyama Y, Bagavant H, Guo X, Gaskin F, Fu SM. Inflammatory stimuli accelerate Sjögren's syndrome-like disease in (NZB x NZW)F1 mice. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1318-1323.

De Paiva CS, Hwang CS, Pitcher JD 3rd, Pangelinan SB, Rahimy E, Chen W, Yoon KC, Farley WJ, Niederkorn JY, Stern ME, Li DQ, Pflugfelder SC. Age-related T-cell cytokine profile parallels corneal disease severity in Sjogren's syndrome-like keratoconjunctivitis sicca in CD25KO mice. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:246-258.

Didenko VV, Hornsby PJ. Presence of double-stranded DNA breaks with single-base 3 overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol*. 1996;135:1369-1376.

Dooms H. Interleukin-7: fuel for the autoimmune attack. *J Autoimmun*. 2013;45:40-48.

Dörner T. Ätiologische und immunpathogenetische Aspekte des Sjögren-Syndroms. *Akt Rheumatol*. 1998; 23:69-77.

Dörner T, Hansen A, Jacobi A, Lipsky PE. Immunoglobulin repertoire analysis provides new insights into the immunopathogenesis of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*. 2002;1:119-124.

Driver JP, Serreze DV, Chen Y-G. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*. 2011;33:67-87.

Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*. 2001;40:275-284.

Feist E, Dörner T, Hansen A. Indikation und Option neuer immunmodulatorischer Therapien beim Sjögren-Syndrom. *Z Rheumatol*. 2007;66:679-685.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440

Feuerer M, Jiang W, Holler PD, Satpathy A, Campbell C, Bogue M, Mathis D, Benoist C. Enhanced thymic selection of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the NOD mouse model of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18181-18186.

Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 1999;42:609-621.

Fosang AJ, Last K, Knäuper V, Murphy G, Neame PJ. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett*. 1996;380:17-20.

Fox RI. Sjögren's syndrome. *Rheumatoid Arthritis*. 1986;55:931-942.

Fox RI. Epidemiology, pathogenesis, animal models, and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 1994;6:501-508.

Fox RI. Sjögren's syndrome. *Lancet*. 2005;366:321-331.

Fox RI, Kang HI. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 1992;18:517-38.



Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 1994;152:5532-5539.

Fox RI, Stern M, Michelson P. Update in Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:391-398.

Fox RI, Fox CM. Researchers look for therapeutic clues to Sjögren's syndrome in neural pathways. *The Rheumatologist* 2013;7(11):1-9.

Gatumu MK, Skarstein K, Papandile A, Browning JL, Fava RA, Bolstad AI. Blockade of lymphotoxin-beta receptor signaling reduces aspects of Sjögren's syndrome in salivary glands of non-obese diabetic mice. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R24

Gao J, Killedar S, Cornelius JG, Nguyen C, Cha S, Peck AB. Sjögren's syndrome in the NOD mouse model is an interleukin-4 time-dependent, antibody isotype-specific autoimmune disease. *J Autoimmun.* 2006;26:90-103.

Gliozzi M, Greenwell-Wild T, Jin W, Moutsopoulos NM, Kapsogeorgou E, Moutsopoulos HM, Wahl SM. A link between interferon and augmented plasmin generation in exocrine gland damage in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2013;40:122-133.

Goicovich E, Molina C, Perez P, Aguilera S, Fernandez J, Olea N, Alliende C, Leyton C, Romo R, Leyton L, Gonzalez MJ. Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Correlations with reduced structural integrity of acini and ducts. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2573-2584.

Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell.* 1990;60:941-951.

Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, Jacques S, Ba N, Ittah M, Lepajolec C, Labetoulle M, Ardizzone M, Sibilia J, Fournier C, Chiocchia G, Mariette X. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:2770-2775.

Grant GM, Cobb JK, Castillo B and Klebe RJ. Regulation of matrix metalloproteinases following cellular transformation. *J Cell Physiol.* 1996;167: 177-183.

Gromnica-Ihle E. Sjögren-Syndrom. In: Qualitätssicherung in der Rheumatologie. Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie; pp. 92-96. Steinkopff Verlag, Heidelberg 2007.

Groom J, Killed SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, Tschopp J, Cachero TG, Batten M, Wheway J, Mauri D, Cavill D, Gordon TP, Mackay CR, Mackay F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 2002;109:59-68.

Hang L, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *J Exp Med*. 1982;155:1690-1701.

Hansen A, Lipsky PE, Dörner T. Immunopathogenesis of primary Sjögren's syndrome: implications for disease management and therapy. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:558-565.

Hansen A, Lipsky PE, Dörner T. B cells in Sjögren's syndrome: indications for disturbed selection and differentiation in ectopic lymphoid tissue. *Arthritis Res Ther*. 2007a;9:R218.

Hansen A, Lipsky PE, Dörner T. B-cell lymphoproliferation in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007b;3:561-569.

Hansen A, Daridon C, Dörner T. What do we know about memory B cells in primary Sjögren's syndrome? *Autoimmun Rev*. 2010a;9:600-603.

Hansen A, Dörner T. Sjögren-Syndrom. *Internist*. 2010b;51:1267-1280.

Hara T, Shitara S, Imai K, Miyachi H, Kitano S, Yao H, Tani-ichi S, Ikuta K. Identification of IL-7-producing cells in primary and secondary lymphoid organs using IL-7-GFP knock-in mice. *J Immunol*. 2012;189:1577-1584.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-1132.

Hartgring SA, Willis CR, Alcorn D, Nelson LJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, van Roon JA. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2716-2725.

Hayashi T, Adachi C, Hasegawa K. Systemic treatment of anti-CD4CD25 T cell monoclonal antibody exacerbates sialoadenitis in submandibular glands during the early life in lupus-prone female NZB x NZWF mice. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:234-240.

Heufler C, Topar G, Grasseger A, Stanzl U, Koch F, Romani N, Namen AE, Schuler G. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med*. 1993;178:1109-1114.

Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibroinogen and factor XII. *J Biol Chem*. 2000;275:33008-33013.

Irmeler I, Bräuer R. Paradoxe Rolle von Interferon- $\gamma$  bei Arthritis. *Z Rheumatol*. 2007;66:591-594.

Ishimaru N, Saegusa K, Yanagi K, Haneji N, Saito I, Hayashi Y. Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjögren's syndrome through fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol.* 1999;155:173-181.

Ishimaru N, Arakaki R, Watanabe M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hayashi Y. Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol.* 2003;163:1481-1490.

Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, Hayashi Y. Novel role for RbAp48 in tissue-specific, estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2924-2935.

Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, Hayashi Y. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med.* 2008;205:2915-2927.

Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J, Lavie F, Lazure T, Ba N, Sellam J, Lepajolec C, Mariette X. B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R51.

Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol.* 2010;72:173-184.

Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:513-533.

Jin JO, Kawai T, Cha S, Yu Q. Interleukin-7 enhances the Th1 response to promote the development of Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy in mice. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2132-2142.

Johnson WE, Lifson JD, Lang SM, Johnson RP, Desrosiers RC. Importance of B-cell responses for immunological control of variant strains of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 2003;77:375-381.

Jonsson MV, Delaleu N, Brokstad KA, Berggreen E, Skarstein K. Impaired salivary gland function in NOD mice: association with changes in cytokine profile but not with histopathologic changes in the salivary gland. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2300-2305.

Jonsson R, Tarkowski A, Bäckman K, Klareskog L. Immunohistochemical characterization of sialadenitis in NZB X NZW F1 mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1987;42:93-101.

Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjögren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol.* 2013;40:1566-1571.

Kassan SS, Moutsopoulos HM. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch Intern Med.* 2004;164:1275-1284.

Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjögren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol.* 2009;175:1167-1177.

Kerr J, Wyllie AR, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.

Kim J, Kang S, Kim J, Kwon G, Koo S. Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Lab Med.* 2013;33:52-59.

Knäuper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem.* 1996;271:17124-17131.

Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med.* 2003;198:1797-1806.

Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, Talal N, Humphreys-Beher MG. Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. *Clin Exp Rheumatol.* 1998;16:675-681.

Konttinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R, Sorsa T, Hietanen J, Ceponis A, Xu JW, Manthorpe R, Whittington J, Larsson A, Salo T, Kjeldsen L, Stenman UH, Eisen AZ. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol.* 1998;17:335-347.

Konttinen YT, Porola P, Konttinen L, Laine M, Poduval P. Immunohistopathology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2006;6:16-20.

Konttinen YT, Fuellen G, Bing Y, Porola P, Stegaev V, Trokovic N, Falk SS, Liu Y, Szodoray P, Takakubo Y. Sex steroids in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2012;39:49-56.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.

Kötter I, Henes JC, Etablierte Medikamente. Neue Einsatzgebiete. *Z Rheumatol.* 2013;72:853-866.

Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell.* 1996;87:811-822.

Krenn V, Jacobs M, Kriegsmann J, Krukemeyer MG, Rieger A. Ist eine bioptische Sicherung beim Sjögren-Syndrom sinnvoll? *Z Rheumatol.* 2010;69:11-18.

Lee BH, Tudares MA, Nguyen CQ. Sjögren's syndrome: an old tale with a new twist. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.).* 2009;57:57-66.

Lee LF, Axtell R, Tu GH, Logronio K, Dilley J, Yu J, Rickert M, Han B, Evering W, Walker MG, Shi J, de Jong BA, Killestein J, Polman CH, Steinman L, Lin JC. IL-7 promotes T<sub>H</sub>1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon- $\beta$  in multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2011;3:93ra68.

Lee LF, Logronio K, Tu GH, Zhai W, Ni I, Mei L, Dilley J, Yu J, Rajpal A, Brown C, Appah C, Chin SM, Han B, Affolter T, Lin JC. Anti-IL-7 receptor- $\alpha$  reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:12674-12679.

Leonard WJ, Shores EW, Love PE. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev*. 1995;148:97-114.

Lodde BM, Mineshiba F, Kok MR, Wang J, Zheng C, Schmidt M, Cotrim AP, Kriete M, Tak PP, Baum BJ. NOD mouse model for Sjögren's syndrome: lack of longitudinal stability. *Oral Dis*. 2006;12:566-572.

Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Sem Immunol*. 2012;24:218-224.

Mackall CL, Fry TJ, Gress RE. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:330-342.

Madrigal-Estebas L, McManus R, Byrne B, Lynch S, Doherty DG, Kelleher D, O'Donoghue DP, Feighery C, O'Farrelly C. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol*. 1997;58:83-90.

Manirarora JN, Kosiewicz MM, Parnell SA, Alard P. APC activation restores functional CD4+CD25+ regulatory T cells in NOD mice that can prevent diabetes development. *PLoS One*. 2008;3:e3739.

Manoussakis MN, Boiu S, Korkolopoulou P, Kapsogeorgou EK, Kavantzias N, Ziakas P, Patsouris E, Moutsopoulos HM. Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren's syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3977-3988.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of epithelial cells in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin Rev Allerg Immunol*. 2007;32:225-230.

Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;35:219-224.

Manthorpe R. Sjögren's syndrome criteria. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:482-484.

Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bio-Essays*. 1992;14:455-463.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9:273-285 (preprint online September 18, 2013).

Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, Acha-Orbea H, Finke D. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity*. 2007;26:643-654.

Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, Spijkervet FK, Abdulahad W, Kamminga N, Brouwer E, Kallenberg CG, Bootsma H. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjögren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2010;62:960-968.

Mellanby RJ, Thomas D, Phillips JM, Cooke A. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology*. 2007;121:15-28.

Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172:2731-2738.

Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, Foucar K, Kjeldsberg CR, Levy N, Nathwani BN. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994;83:1460-1466.

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1996;97:761-768.

Morgan W, Castlemen B. A clinicopathologic study of Mikulicz's disease. *Am J Pathol*. 1953;29:471.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-2357.

Moutsopoulos HM. Sjögren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72:162-165.

Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheum*. 2000;12:186-194.

Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark J. Matrix metalloproteinases in arthritis disease. *Arthritis Res*. 2002;4:39-49.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009.

Nguyen C, Cornelius J, Singson E, Killedar S, Cha S, Peck AB. Role of complement and B lymphocytes in Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy of NOD.B10-H2b mice. *Mol Immunol*. 2006a;43:1332-1339.

Nguyen C, Singson E, Kim JY, Cornelius JG, Attia R, Doyle ME, Bulosan M, Cha S, Peck AB. Sjögren's syndrome-like disease of C57BL/6.NOD-Aec1 Aec2 mice: gender differences in keratoconjunctivitis sicca defined by a cross-over in the chromosome 3 Aec1 locus. *Scand J Immunol*. 2006b;64:295-307.

Nguyen CQ, Gao JH, Kim H, Saban DR, Cornelius JG, Peck AB. IL-4-STAT6 signal transduction-dependent induction of the clinical phase of Sjögren's syndrome-like disease of the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*. 2007;179:382-390.

Nguyen CQ, Hu MH, Li Y, Stewart C, Peck AB. Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice. *Arthritis Rheum*. 2008;58:734-743.

Nguyen CQ, Sharma A, Lee BH, She JX, McIndoe RA, Peck AB. Differential gene expression in the salivary gland during development and onset of xerostomia in Sjögren's syndrome-like disease of the C57BL/6.NOD-Aec1Aec2 mouse. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:R56.

Nguyen CQ, Yin H, Lee BH, Chiorini JA, Peck AB. IL17: potential therapeutic target in Sjögren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. *Lab Invest*. 2011; 9:54-62.

Nguyen KH, Brayer J, Cha S, Diggs S, Yasunari U, Hilal G, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated secretory dysfunction in NOD mice. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2297-2306.

Nocturne G, Marietta X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9:544-556.

Osnes LT, Nakken B, Bodokay E, Szodoray P. Assessment of intracellular cytokines and regulatory cells in patients with autoimmune diseases and primary immunodeficiencies – novel tool for diagnostics and patients follow-up. *Autoimmun Rev*. 2013;12:967-971.

Park JH, Adoro S, Guintert T, Erman B, Alag AS, Catalfamo M, Kimura MY, Cui Y, Lucas PJ, Gress RE, Kubo M, Hennighausen L, Feigenbaum L, Singer A. Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat Immunol*. 2010;11: 257-264.

Pearson C, Silva A, Saini M, Seddon B. IL-7 determines the homeostatic fitness of T cells by distinct mechanisms at different signalling thresholds in vivo. *Eur J Immunol*. 2011;41:3656-3666.

Penaranda C, Kuswanto W, Hofmann J, Kenefeck R, Narendran P, Walker LS, Bluestone JA, Abbas AK, Dooks H. IL-7 receptor blockade reverses autoimmune

diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:12668-12673.

Pérez P, Goicovich E, Alliende C, Aguilera S, Leyton C, Molina C, Pinto R, Romo R, Martínez B, González MJ. Differential expression of matrix metalloproteinases in labial salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2807-2817.

Pérez P, Kwon YJ, Alliende C, Leyton L, Aguilera S, Molina C, Labra C, Julio M, Leyton C, González MJ. Increased acinar damage of salivary glands of patients with Sjögren's syndrome is paralleled by simultaneous imbalance of matrix metalloproteinase 3/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and matrix metalloproteinase 9/tissue inhibitor of metalloproteinases 1 ratios. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2751-2760.

Pongratz G, Anthofer JM, Melzer M, Anders S, Grässel S, Straub RH. IL-7 receptor  $\alpha$  expressing B cells act proinflammatory in collagen-induced arthritis and are inhibited by sympathetic neurotransmitters. *Ann Rheum Dis*. 2013 Mar 16. [Epub ahead of print].

Puéchal X, Gottenberg JE, Berthelot JM, Gossec L, Meyer O, Morel J, Wendling D, de Bandt M, Houvenagel E, Jamard B, Lequerré T, Morel G, Richette P, Sellam J, Guillevin L, Mariette X. Rituximab therapy for systemic vasculitis associated with rheumatoid arthritis: Results from the AutoImmunity and Rituximab Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64:331-339.

Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Font J. Primary Sjögren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:347-354.

Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Muñoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86:242-251.

Ramos-Casals M, Solans R, Rosas J, Camps MT, Gil A, Del Pino-Montes J, Calvo-Alen J, Jiménez-Alonso J, Micó ML, Beltrán J, Belenguer R, Pallarés L. Primary Sjögren syndrome in Spain: clinical and immunologic expression in 1010 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87: 210-219.

Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Stone JH, Sisó A, Bosch X. Treatment of primary Sjögren syndrome: a systematic review. *JAMA*. 2010;304:452-460.

Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Sisó-Almirall A, Bosch X, Tzioufas AG. Topical and systemic medications for the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:399-411.

Rasmussen A, Ice JA, Li H, Grundahl K, Kelly JA, Radfar L, Stone DU, Hefner KS, Anaya JM, Rohrer M, Gopalakrishnan R, Houston GD, Lewis DM, Chodosh J, Harley JB, Hughes P, Maier-Moore JS, Montgomery CG, Rhodus NL, Farris AD, Segal BM, Jonsson R, Lessard CJ, Scofield RH, Sivils KL. Comparison of the American-European Consensus Group Sjögren's syndrome classification criteria to newly proposed American College of Rheumatology criteria in a large, carefully



characterised sicca cohort. *Ann Rheum Dis*. 2013; Oct. 23; doi:10.1136 [Epub ahead of print].

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1996;97:2011-2019.

Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376:345-355.

Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JW, van Roon JA. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;42:368-376.

Robinson CP, Yamamoto H, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD (nonobese diabetic)-scid mouse in the absence of detectable lymphocyte infiltration: a potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;79:50-59.

Robinson CP, Cornelius J, Bounous DE, Yamamoto H, Humphreys-Beher MG, Peck AB. Characterization of the changing lymphocyte populations and cytokine expression in the exocrine tissues of autoimmune NOD mice. *Autoimmunity*. 1998a; 27:29-44.

Robinson CP, Brayer J, Yamachika S, Esch TR, Peck AB, Stewart CA, Peen E, Jonsson R, Humphreys-Beher MG. Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic Igmu null mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998b; 95:7538-7543.

Robinson CP, Yamachika S, Bounous DI, Brayer J, Jonsson R, Holmdahl R, Peck AB, Humphreys-Beher MG. A novel NOD-derived murine model of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1998c;41:150-156.

Roescher N, Tak PP, Illei GG. Cytokines in Sjögren's syndrome. *Oral Dis*. 2009;15: 519-526.

Roescher N, Tak PP, Illei GG. Cytokines in Sjögren's syndrome: potential therapeutic targets. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:945-948.

Roescher N, Lodde BM, Vosters JL, Tak PP, Catalan MA, Illei GG, Chiorini JA. Temporal changes in salivary glands of non-obese diabetic mice as a model for Sjögren's syndrome. *Oral Dis*. 2012;18:96-106.

Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Invest*. 1995;15:121-129.

Romeis B. *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Hrsg. P. Böck. Urban & Schwarzenberg, Wien-München-Baltimore 1989.

Routsias JG, Tzioufas AG. Autoimmune response and target autoantigens in Sjögren's syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2010;40:1026-1036.

Saadoun D, Terrier B, Bannock J, Vazquez T, Massad C, Kang I, Joly F, Rosenzweig M, Sene D, Benech P, Musset L, Klatzmann D, Meffre E, Cacoub P. Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjögren's syndrome-associated lymphoproliferation. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1085-1096.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999;107:489-506.

Saito I, Haruta K, Shimuta M, Inoue H, Sakurai H, Yamada K, Ishimaru N, Higashiyama H, Sumida T, Ishida H, Suda T, Noda T, Hayashi Y, Tsubota K. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol.* 1999;162:2488-2494.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-64.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-562.

Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol.* 2008;181:2898-2906.

Schumacher HR, Bautista BB, Krauser RE, Mathur AK, Gall EP. Histological appearance of the synovium in early rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1994; 23: 3-10.

Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* 2003;7:680-686.

Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C; EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1103-1109.

Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, Ramos-Casals M, Dörner T, Bombardieri S, Hachulla E, Brun JG, Kruize AA, Praprotnik S, Tomsic M, Gottenberg JE, Devauchelle V, Devita S, Vollenweider C, Mandl T, Tzioufas A, Carsons S, Saraux A, Sutcliffe N, Vitali C, Bowman SJ; EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:968-972.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201:723-735.

Sharma R, Zheng L, Guo X, Fu SM, Ju ST, Jarjour WN. Novel animal models for Sjögren's syndrome: expression and transfer of salivary gland dysfunction from regulatory T cell-deficient mice. *J Autoimmun.* 2006;27:289-296.

Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Holländer GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, Ikuta K. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta^+$  intraepithelial lymphocytes. *J Immunol.* 2013;190:6173-6179.

Singh B, Rabinovitch A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. *Autoimmunity.* 1993;15(3):209-13.

Sjögren HS. Zur Kenntnis der keratoconjunktivitis sicca. *Acta Ophthalmol.* 1933;11 (suppl.II):1-151.

Skarstein K, Nerland AH, Eidsheim M, Mountz JD, Jonsson R. Lymphoid cell accumulation in salivary glands of autoimmune MRL mice can be due to impaired apoptosis. *Scand J Immunol.* 1997;46:373-378.

Spachidou MP, Bourazopoulou E, Maratheftis CI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Manoussakis MN. Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:497-503.

Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naïve cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol.* 2011;12:478-484.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.

Steinman L. A brief history of T<sub>H</sub>17, the first major revision in the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13:139-145.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-245.

Sudo T, Ito M, Ogawa Y, Iizuka M, Kodama H, Kunisada T, Hayashi S, Ogawa M, Sakai K, Nishikawa S. Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med.* 1989;170:333-338.

Sudo T, Nishikawa S, Ohno N, Akiyama N, Tamakoshi M, Yoshida H, Nishikawa S. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:9125-129.

Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008;29:848-862.

Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Shiina M, Mihara M. IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression. *Cytokine.* 2010;51:178-183.

Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct.* 2003;28:23-29.

Tanaka A, O'Sullivan FX, Koopman WJ, Gay S. Ultrastructural study of Sjögren's syndrome-like disease in MRL/l mice. *J Oral Pathol.* 1988;17:460-465.

Tengnér P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1998;41:2238-2248.

Timmer TC, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TW, Tak PP, Verweij CL, Mebius RE, van der Pouw Kraan TC. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2492-2502.

Toda I, Sullivan BD, Rocha EM, Da Silveira LA, Wickham LA, Sullivan DA. Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res.* 1999;69:355-366.

Tonkin DR, He J, Barbour G, Haskins K. Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo. *J Immunol.* 2008;181:4516-4522.

Tzioufas AG, Wassmuth R, Dafni UG, Guialis A, Haga HJ, Isenberg DA, Jonsson R, Kalden JR, Kiener H, Sakarellos C, Smolen JS, Sutcliffe N, Vitali C, Yiannaki E, Moutsopoulos HM. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro/SSA, La/SSB and their linear epitopes in primary Sjögren's syndrome (pSS): a European multicentre study. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:398-404.

Tzioufas AG, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. What we know and what we should learn. *J Autoimmun.* 2012;39:4-8.

Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri VM. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol.* 1998;152:1489-1499.

van Blokland SC, van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP, Versnel MA. Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjögren's syndrome: a differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab Invest.* 2000;80:575-585.

van Blokland SCA, Versnel MA. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. *Clin Immunol.* 2002;103:111-124.

van der Laan WH, Pap T, Roday HK, Grimbergen JM, Huisman LG, TeKoppele JM, Breedveld FC, Gay RE, Gay S, Huizinga TW, Verheijen JH, Quax PH. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene

transfer of a cell surface-targeted plasmin inhibitor. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1710-1718.

van Roon JA, Hartgring SA, van der Wurff-Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Numbers of CD25+Foxp3+ T cells that lack the IL-7 receptor are increased intra-articularly and have impaired suppressive function in RA patients. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:2084-2089.

van Roon JA, Kruize AA, Radstake TR. Editorial: interleukin-7 and its receptor: the axis of evil to target in Sjögren's syndrome? *Arthritis Rheum.* 2013;65:1980-1984.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:554-558.

Vitali C, Bootsma H, Bowman SJ, Dörner T, Gottenberg JE, Mariette X, Ramos-Casals M, Ravaud P, Seror R, Theander E, Tzioufas AG. Classification criteria for Sjögren's syndrome: we actually need to definitively resolve the long debate on the issue. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:476-478.

Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*) Solothurn: Jent und Gassman, 1842;130.

Vosters JL, Landek-Salgado MA, Yin H, Swaim WD, Kimura H, Tak PP, Caturegli P, Chiorini JA. Interleukin-12 induces salivary gland dysfunction in transgenic mice, providing a new model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2009a;60:3633-3641.

Vosters JL, Yin H, Roescher N, Kok MR, Tak PP, Chiorini JA. Local expression of tumor necrosis factor-receptor 1:immunoglobulin G can induce salivary gland dysfunction in a murine model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2009b;11:R189.

Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:529-537.

Wang B, Gonzalez A, Höglund P, Katz JD, Benoist C, Mathis D. Interleukin-4 deficiency does not exacerbate disease in NOD mice. *Diabetes.* 1998;47:1207-1211.

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest.* 1995;95:2945-2953.

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med.* 1998;187:398-402.

Watanabe Y, Mazda O, Aiba Y, Iwai K, Gytoku J, Ideyama S, Miyazaki J, Katsura Y. A murine thymic stromal cell line which may support the differentiation of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cell receptor positive T cells. *Cell Immunol.* 1992; 142:385-397.

Westhoff G, Zink A. Epidemiologie des primären Sjögren-Syndroms. *Z Rheumatol.* 2010;69:41-49.

Willeke P. Das Sjögren Syndrom - Welche Therapiemöglichkeiten gibt es? Deutscher Sjögren-Tag, 2002.

Wildenberg ME, Welzen-Coppens JM, van Helden-Meeuwsen CG, Bootsma H, Vissink A, van Rooijen N, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. Increased frequency of CD16<sup>+</sup> monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjögren syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:420-426.

Witte T. Pathogenese und Diagnostik des Sjögren-Syndroms. *Z Rheumatol.* 2010; 69:50-56.

Wogensen L, Lee MS, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1994;179:1379-1384.

Yamachika S, Nanni JM, Nguyen KH, Garces L, Lowry JM, Robinson CP, Brayer J, Oxford GE, da Silveira A, Kerr M, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Excessive synthesis of matrix metalloproteinases in exocrine tissues of NOD mouse models for Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 1998;25:2371-2380.

Yamakawa M, Weinstein R, Tsuji T, McBride J, Wong DT, Login GR. Age-related alterations in IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 concentrations in parotid acinar cells from BALB/c and non-obese diabetic mice. *J Histochem Cytochem.* 2000;48:1033-1042.

Yamamoto M, Harada S, Ohara M, Suzuki C, Naishiro Y, Yamamoto H, Takahashi H, Imai K. Clinical and pathological differences between Mikulicz's disease and Sjögren's syndrome. *Rheumatology.* 2005a;44:227-234.

Yamamoto M, Takahashi H, Sugai S, Imai K. Clinical and pathological characteristics of Mikulicz's disease (IgG4-related plasmacytic exocrinopathy). *Autoimmun Rev.* 2005b;4:195-200.

Yamano S, Atkinson JC, Baum BJ, Fox PC. Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/c mice. *Clin Immunol.* 1999;92:265-275.

Yanagi K, Ishimaru N, Haneji N, Saegusa K, Saito I, Hayashi Y. Anti-120-kDa  $\alpha$ -fodrin immune response with Th1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol.* 1998;28:3336-3345.

Youinou P, Devauchelle-Pensec V, Pers JO. Significance of B cells and B cell clonality in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2605-2610.

Youinou P, Pers JO. Disturbance of cytokine networks in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R227.

Zheng XX, Steele AW, Hancock WW, Stevens AC, Nickerson PW, Roy-Chaudhury P, Tian Y, Strom TB. A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J Immunol*. 1997; 158:4507-4513.

Zimmerman K, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001;92:57-70.

## **7 Anlagen**

### **7.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Peter Oelzner

Prof. Dr. med. Gert Hein

Dr. med. Peter Petrow

Dr. med. Mięczysław Gajda

Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer

Frau Dipl. Ing. Renate Stöckigt

Frau Cornelia Hüttich

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Großrückerswalde, 16.06.2014

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers



## 7.2 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und für die Unterstützung bei der Bewertung und Diskussion der Ergebnisse danke ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Oelzner.

Herrn Prof. Dr. med. Gert Hein und Herrn Prof. Dr. med. Peter Oelzner danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben und klinischen Daten, Herrn Prof. Dr. Harald Illges für die Zurverfügungstellung der benötigten NOD-Mäuse.

Herrn Oberarzt Dr. med. Mieczyslaw Gajda und Herrn Dr. med. Peter Petrow danke ich für die Unterstützung bei der Beurteilung der histologischen und immunhistochemischen Präparate und deren Hilfe zur entsprechenden Dokumentation.

Herrn PD Dr. med. Oliver Frey danke ich für die Glucosebestimmungen im Serum der Versuchstiere und Herrn Dr. rer. nat. Matthias Ebbinghaus für die Beratung und Hilfe bei der Dokumentation der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der Labors sowie die ständige Unterstützung und Beratung insbesondere zu Fragen und Problemen bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Frau Dipl. Ing. Renate Stöckigt möchte ich sehr für Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Cornelia Hüttich für die nie endende Hilfe und Zuarbeit bei der Anfertigung der entsprechenden histologischen und immunhistochemischen Präparate bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinem Vater und meiner Partnerin Jenny, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit motiviert und begleitet haben.